Ovaj je tekst namijenjen isključivo dokumentiranju i nema pravni učinak. Institucije Unije nisu odgovorne za njegov sadržaj. Vjerodostojne inačice relevantnih akata, uključujući njihove preambule, one su koje su objavljene u Službenom listu Europske unije i dostupne u EUR-Lexu. Tim službenim tekstovima može se izravno pristupiti putem poveznica sadržanih u ovom dokumentu.

►B

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 440/2008

od 30. svibnja 2008.

o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH)

(Tekst značajan za EGP)

(SL L 142, 31.5.2008., str. 1.)

Koju je izmijenila:

		Službeni list		
		br.	stranica	datum
►M1	Uredba Komisije (EZ) br. 761/2009 od 23. srpnja 2009.	L 220	1	24.8.2009.
►M2	Uredba Komisije (EU) br. 1152/2010 od 8. prosinca 2010.	L 324	13	9.12.2010.
►M3	Uredba Komisije (EU) br. 640/2012 od 6. srpnja 2012.	L 193	1	20.7.2012.
►M4	Uredba Komisije (EU) br. 260/2014 od 24. siječnja 2014.	L 81	1	19.3.2014.
►M5	Uredba Komisije (EU) br. 900/2014 od 15. srpnja 2014.	L 247	1	21.8.2014.
►M6	Uredba Komisije (EU) 2016/266 od 7. prosinca 2015.	L 54	1	1.3.2016.
►M7	Uredba Komisije (EU) 2017/735 od 14. veljače 2017.	L 112	1	28.4.2017.
►M8	Uredba Komisije (EU) 2019/1390 od 31. srpnja 2019.	L 247	1	26.9.2019.

▼B

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 440/2008

od 30. svibnja 2008.

o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH)

(Tekst značajan za EGP)

Članak 1.

Ispitne metode koje se trebaju primjenjivati u svrhe Uredbe 1907/2006/EZ utvrđuju se u Prilogu ovoj Uredbi.

Članak 2.

Komisija prema potrebi preispituje ispitne metode obuhvaćene ovom Uredbom s ciljem zamjene, smanjenja broja ili usavršavanja pokusa na kralježnjacima.

Članak 3.

Sva upućivanja na Prilog V. Direktivi 67/548/EEZ smatraju se upućivanjima na ovu Uredbu.

Članak 4.

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

Ona se primjenjuje od 1. lipnja 2008.

▼B

PRILOG

▼M6

Napomena:

Prije nego što se bilo koja od sljedećih ispitnih metoda primijeni za ispitivanje složene smjese (MCS), smjese nepoznatog ili promjenjivog sastava, kompleksnog reakcijskog produkta ili biološkog materijala (UVCB) ili smjese te ako njezina primjenjivost za ispitivanje MCS-a, UVCB-a ili smjesa nije navedena u odgovarajućoj metodi testiranja, potrebno je razmotriti je li metoda prikladna za predviđenu regulatornu svrhu.

Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje MCS-a, UVCB-a ili smjese, na raspolaganju bi trebalo biti što više informacija o sastavu smjese, npr. o kemijskom identitetu njezinih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i relevantnim svojstvima.

▼B

DIO A: METODE ZA ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA

SADRŽAJ

A.1. TEMPERATURA TALJENJA/SKRUĆIVANJA

A.2. TEMPERATURA VRENJA

A.3. RELATIVNA GUSTOĆA

A.4. TLAK PARE

A.5. POVRŠINSKA NAPETOST

A.6. TOPLJIVOST U VODI

A.8. KOEFICIJENT RAZDJELJENJA

A.9. PLAMIŠTE

A.10. ZAPALJIVOST (KRUTINE)

A.11. ZAPALJIVOST (PLINOVI)

A.12. ZAPALJIVOST (U DODIRU S VODOM)

A.13. PIROFORNA SVOJSTVA KRUTINA I TEKUĆINA

A.14. EKSPLOZIVNA SVOJSTVA

A.15. TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA (TEKUĆINE I PLINOVI)

A.16. RELATIVNA TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA ZA KRUTINE

A.17. SVOJSTVA OKSIDACIJE (KRUTINE)

A.18. OPĆI PROSJEK MOLEKULSKE TEŽINE I RASPODJELA MOLEKULSKE TEŽINE POLIMERA

A.19. SADRŽAJ MALE MOLEKULSKE TEŽINE U POLIMERIMA

A.20. PONAŠANJE POLIMERA U VODI - OTAPANJE/EKSTRAKCIJA

A.21. SVOJSTVA OKSIDACIJE (TEKUĆINE)

A.22. ODREĐIVANJE SREDNJEGA GEOMETRIJSKOG PROMJERA VLAKANA POMOĆU DULJINE

A.23. KOEFICIJENT RAZDJELJENJA (1-OKTANOL/VODA): METODA SPOROG MIJEŠANJA

A.24. KOEFICIJENT RAZDJELJENJA (N-OKTANOL/VODA), METODA VISOKOUČINKOVITE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC)

A.25. KONSTANTE DISOCIJACIJE U VODI (TITRACIJSKA METODA – SPEKTROFOTOMETRIJSKA METODA – KONDUKTOMETRIJSKA METODA)

▼B

A.1. TEMPERATURA TALJENJA/SKRUĆIVANJA

1. METODA

Većina opisanih metoda zasniva se na Smjernici za ispitivanje OECD-a (1). Temeljna načela navedena su u referencama (2) i (3).

1.1. UVOD

Opisane metode i uređaji koristit će se za određivanje temperature taljenja tvari, bez ikakvih ograničenja s obzirom na stupanj njihove čistoće.

Izbor metode ovisi o naravi tvari koja se ispituje. Stoga će ograničavajući čimbenik biti činjenica može li se tvar fino usitniti lako, teško ili nikako.

Za neke je tvari primjerenije određivati temperature skrućivanja ili očvršćivanja te su u ovu metodu uključene i norme za njihovo određivanje.

Ako, zbog posebnih svojstava tvari, niti jedan od navedenih parametara nije prikladan za mjerenje, može biti prikladno izmjeriti točku stinjavanja.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Temperatura taljenja definira se kao temperatura kod koje dolazi do faznog prijelaza iz krutog u tekuće stanje pod atmosferskim tlakom, a ta temperatura idealno odgovara temperaturi skrućivanja.

Kako do faznog prijelaza mnogih tvari dolazi unutar temperaturnog područja, često se definira kao područje taljenja.

Pretvaranje jedinica (K u °C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura u Celzijusima, stupanj Celzijusa (°C)

T: Termodinamička temperatura, kelvin (K)

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari nije potrebno upotrebljavati kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

Neke tvari za kalibraciju navedene su u referencama (4).

▼B

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Određuje se temperatura (temperaturno područje) faznog prijelaza iz krutog u tekuće stanje ili iz tekućeg u kruto stanje. U praksi, kad se uzorak ispitivane tvari zagrijava/hladi pod atmosferskim tlakom, određuju se temperature početne faze taljenja/skrućivanja i konačne faze taljenja/skrućivanja. Opisano je pet vrsta metoda, poimence: metoda kapilare, metode vrućih faza, određivanja temperature skrućivanja, metode termičke analize i određivanje točke stinjavanja (metoda razvijena za naftne derivate).

U određenim slučajevima možda je prikladnije mjeriti temperaturu skrućivanja nego temperaturu taljenja.

1.4.1. **Metoda kapilare**

1.4.1.1. *Uređaji za mjerenje temperature taljenja u kupki*

Mala količina fino usitnjene tvari stavlja se u kapilarnu cjevčicu i čvrsto sabije. Cjevčica se zagrijava zajedno s termometrom, a kad taljenje zaista započne, porast temperature podešava se na manje od oko 1 K/min. Utvrđuju se početna i konačna temperatura taljenja.

1.4.1.2. *Uređaji za mjerenje temperature taljenja u metalnom bloku*

Kao što je opisano u 1.4.1.1., osim što se kapilarna cjevčica i termometar stavljaju u zagrijani metalni blok i mogu se promatrati kroz otvore u bloku.

1.4.1.3. *Detekcija pomoću fotoćelija*

Uzorak u kapilarnoj cjevčici automatski se zagrijava u metalnom cilindru. Zraka svjetlosti usmjerava se kroz tvar, putem otvora u cilindru, na precizno kalibriranu fotoćeliju. Optička svojstva većine tvari taljenjem se mijenjaju iz mutnih u prozirne. Jakost svjetlosti koja dolazi na fotoćeliju povećava se i šalje signal za zaustavljanje digitalnom pokazivaču na kojem se temperatura očitava na otporničkom termometru izvedenom od platine koji se nalazi u komori za zagrijavanje. Ova metoda nije prikladna za neke jako obojene tvari.

1.4.2. **Vruće faze**

1.4.2.1. *Koflerov vrući štap*

Koflerov vrući štap ima dva komada metala različite termičke provodljivosti, koji se zagrijavaju električki, s tim da je štap izveden na način da je temperaturni gradijent cijelom svojom dužinom gotovo linearan. Temperatura vrućeg štapa može se kretati u području od 283 do 573 K zahvaljujući spravi za očitavanje temperature koja je posebno konstruirana za takav štap, a koja sadrži klizni pokazivač sa strelicom na skali. Kako bi se odredila temperatura taljenja, tvar se postavlja u tankom sloju izravno na površinu vrućega štapa. Za nekoliko sekundi razvija se oštra crta koja razdvaja tekuću od krute faze. Temperatura u visini razdjelne crte očitava se podešavanjem pokazivača na tu crtu.

▼B

1.4.2.2. *Mikroskop za taljenje*

Za određivanje temperatura taljenja vrlo malih količina materijala u uporabi je nekoliko mikroskopskih vrućih faza. U većini se vrućih faza temperatura mjeri osjetljivim termoparom, iako se ponekad koriste živini termometri. Tipični uređaj za mjerenje temperature taljenja mikroskopskom vrućom fazom ima komoru za zagrijavanje koja sadrži metalnu pločicu na koju se postavlja uzorak na stakalcu. Na sredini metalne pločice nalazi se otvor koji omogućava prolaz svjetla sa zrcala za osvjetljavanje na mikroskopu. Kad je u upotrebi, komora se zatvara staklenom pločom kako zrak ne bi ulazio u područje na kojem se nalazi uzorak.

Zagrijavanje uzorka regulirano je reostatom. Za vrlo precizna mjerenja optički anizotropnih tvari može se koristiti polarizirano svjetlo.

1.4.2.3. *Metoda meniska*

Ova se metoda koristi posebno za poliamide.

Temperatura na kojoj dolazi do pomaka meniska silikonskog ulja, zatvorenog između vruće faze i staklenog poklopca postavljenog iznad uzorka poliamida koji se ispituje, određuje se vizualno.

1.4.3. **Metoda određivanja temperature skrućivanja**

Uzorak se stavlja u posebnu epruvetu i zatim u uređaj za određivanje temperature skrućivanja. Uzorak se lagano miješa tijekom cijelog postupka hlađenja, a temperatura se mjeri u odgovarajućim intervalima. Čim temperatura postane stalna u nekoliko očitavanja, ta se temperatura (uz ispravak greške termometra) bilježi kao temperatura skrućivanja.

Obvezno treba izbjegavati pretjerano hlađenje kako bi se održala ravnoteža između krute i tekuće faze.

1.4.4. **Termička analiza**

1.4.4.1. *Diferencijalna termička analiza (DTA)*

Ovom se tehnikom bilježi razlika između temperature tvari i temperature referentnog materijala kao funkcije temperature, dok su tvar i referentni materijal podvrgnuti istom kontroliranom temperaturnom programu. Kad na uzorku dođe do prijelaza koji obuhvaća promjenu entalpije, ta se promjena pokazuje endotermnim (taljenje) ili egzotermnim (skrućivanje) odstupanjem od osnovne crte zabilježene temperature.

▼B

1.4.4.2. *Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)*

Ovom se tehnikom bilježi razlika između ulaza energije u tvar i u referentni materijal, kao funkcije temperature, dok su tvar i referentni materijal podvrgnuti istom kontroliranom temperaturnom programu. Ta energija predstavlja energiju koja je potrebna kako bi se između tvari i referentnog materijala postigla nulta temperaturna razlika. Kad na uzorku dođe do prijelaza koji obuhvaća promjenu entalpije, ta se promjena pokazuje endotermnim (taljenje) ili egzotermnim (skrućivanje) odstupanjem od osnovne crte zabilježenog protoka topline.

1.4.5. **Točka stinjavanja**

Ova je metoda razvijena za primjenu kod naftnih derivata i pogodna je za primjenu kod naftnih tvari niskih temperatura taljenja.

Nakon predgrijavanja, uzorak se hladi određenom brzinom i karakteristike protoka ispituju se u intervalima od 3 K. Najniža temperatura na kojoj se uočava gibanje tvari bilježi se kao točka stinjavanja.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Primjenljivost i točnost različitih metoda koje se rabe za određivanje temperature taljenja/područja taljenja navedene su u sljedećoj tablici:

TABLICA: PRIMJENLJIVOST METODA

A. **Metode kapilare**

Metoda mjerenja	Tvari koje je moguće fino usitniti	Tvari koje je teško fino usitniti	Temperaturno područje	Procijenjena točnost [1]	Postojeće norme
Uređaji za mjerenje temperature taljenja u kupki	da	samo na neke	273 do 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Mjerenje temperature taljenja metalnim blokom	da	samo na neke	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekcija pomoću fotoćelija	da	nekoliko uz primjenu uređaja	253 do 573 K	± 0,5 K	

[1] Ovisno o tipu instrumenta i stupnju čistoće tvari

▼B

B. **Metode vrućih faza i metode skrućivanja**

Metoda mjerenja	Tvari koje je moguće fino usitniti	Tvari koje je teško fino usitniti	Temperaturno područje	Procijenjena točnost (1)	Postojeće norme
Koflerov vrući štap	da	ne	283 do > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Mikroskop za taljenje	da	samo na neke	273 do > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda meniska	ne	posebno za poliamide	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Temperatura skrućivanja	da	da	223 do 573 K	± 0,5 K	Npr. BS 4695

(1) Ovisno o tipu instrumenta i stupnju čistoće tvari

C. **Termička analiza**

Metoda mjerenja	Tvari koje je moguće fino usitniti	Tvari koje je teško fino usitniti	Temperaturno područje	Procijenjena točnost (1)	Postojeće norme
Diferencijalna termička analiza	da	da	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferencijalna pretražna kalorimetrija	da	da	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Ovisno o tipu instrumenta i stupnju čistoće tvari

D. **Točka stinjavanja**

Metoda mjerenja	Tvari koje je moguće usitniti	Tvari koje je teško fino usitniti	Temperaturno područje	Procijenjena točnost (1)	Postojeće norme
Točka stinjavanja	Za naftne derivate i naftne tvari	Za naftne derivate i naftne tvari	223 do 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Ovisno o tipu instrumenta i stupnju čistoće tvari

1.6. OPIS METODA

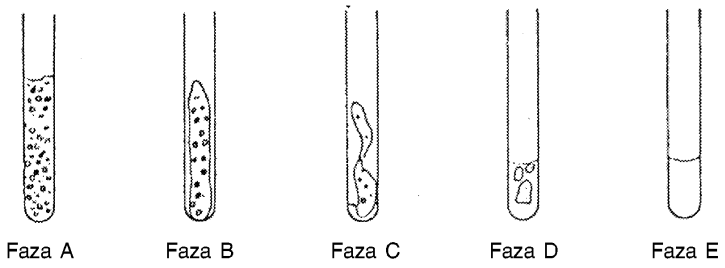
Postupci gotovo svih ispitnih metoda opisani su međunarodnim i nacionalnim normama (vidjeti Dodatak 1.).

1.6.1. **Metode s kapilarnom cjevčicom**

Kad su izložene polaganom rastu temperature, za fino usitnjene tvari obično vrijede faze taljenja prikazane na slici 1.

▼B

Slika 1.



Faza A (početak taljenja): fine kapljice jednoliko prianjaju na unutrašnju stijenku kapilarne cjevčice

Faza B pojavljuje se zračnost između uzorka i unutrašnje stijenke uslijed stezanja taline

Faza C stegnuti uzorak počinje padati i ukapljuje se

Faza D na površini nastaje potpun menisk dok znatna količina uzorka ostaje kruta

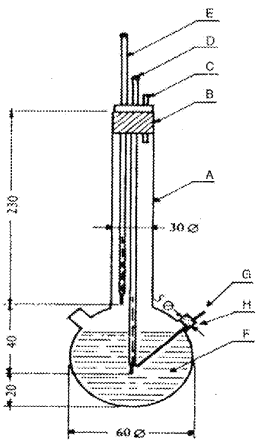
Faza E (konačna faza taljenja): nema krutih čestica

Tijekom određivanja temperature taljenja, temperature se bilježe na početku taljenja i u konačnoj fazi.

1.6.1.1. *Uređaji za mjerenje temperature taljenja u kupki*

Slika 2. prikazuje standardizirani uređaj za mjerenje temperature taljenja izrađen od stakla (JIS K 0064); sve dimenzije izražene su u milimetrima.

Slika 2.



A: Mjerna posuda
B: Zatvarač
C: Odzračnik
D: Termometar
E: Pomoćni termometar
F: Tekućina u kupki
G: Staklena kapilarna cjevčica, duljine od 80 do 100 mm, unutrašnjeg promjera 1,0 ± 0,2 mm, debljine stijenke od 0,2 do 0,3 mm
H: Bočna cijev

▼B

Tekućina u kupki:

Treba odabrati odgovarajuću tekućinu. Izbor tekućine ovisi o temperaturi taljenja koja se određuje, npr. tekući parafin za temperature taljenja do 473 K, silikonsko ulje za temperature taljenja do 573 K.

Za temperature taljenja iznad 523 K može se upotrijebiti mješavina koja se sastoji od tri dijela sumporne kiseline i dva dijela kalijevog sulfata (u masenom omjeru). Ako se upotrebljava takva mješavina, treba poduzeti odgovarajuće mjere opreza.

Termometar:

Treba koristiti samo termometre koji zadovoljavaju uvjete sljedećih ili ekvivalentnih normi:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Postupak:

Suha tvar fino se usitni u tarioniku, stavlja se u kapilarnu cjevčicu koja je stopljena na jednom kraju, na način da je nakon čvrstog sabijanja razina punjenja otprilike 3 mm. Kako bi se dobio jednolično sabijen uzorak, kapilarnu cjevčicu treba spustiti s visine od otprilike 700 mm kroz staklenu cijev vertikalno na pokazno staklo.

Napunjena kapilarna cjevčica postavlja se u posudu na način da srednji dio kuglice termometra ispunjene živom dodiruje kapilarnu cjevčicu u dijelu u kojem je smješten uzorak. Kapilarna cjevčica obično se uvodi u uređaj oko 10 K ispod temperature taljenja.

Tekućina u posudi zagrijava se na način da temperatura raste otprilike 3 K/min. Tekućinu treba miješati. Na oko 10 K ispod očekivane temperature taljenja, brzina porasta temperature podešava se do maksimalno 1 K/min.

Izračun:

Izračun temperature taljenja je sljedeći:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$

gdje je:

T = ispravljena temperatura tališta u K

T_D = očitanje temperature na termometru D u K

T_E = očitanje temperature na termometru E u K

n = broj stupnjeva žive na termometru D u pari koja se pojavljuje na površini

1.6.1.2. *Uređaj za određivanje temperature taljenja u metalnom bloku*

Uređaj:

Dijelovi uređaja:

— cilindrični metalni blok čiji je gornji dio šupalj i oblikuje komoru (vidjeti sliku 3.),

— metalni čep, s dva ili više otvora, za umetanje cjevčica u metalni blok,

▼B

— sustav za zagrijavanje metalnog bloka, koji se uspostavlja primjerice električnim otpornikom ugrađenim u kućištu bloka,

— reostat za regulaciju ulaza energije, ako se rabi električno grijanje,

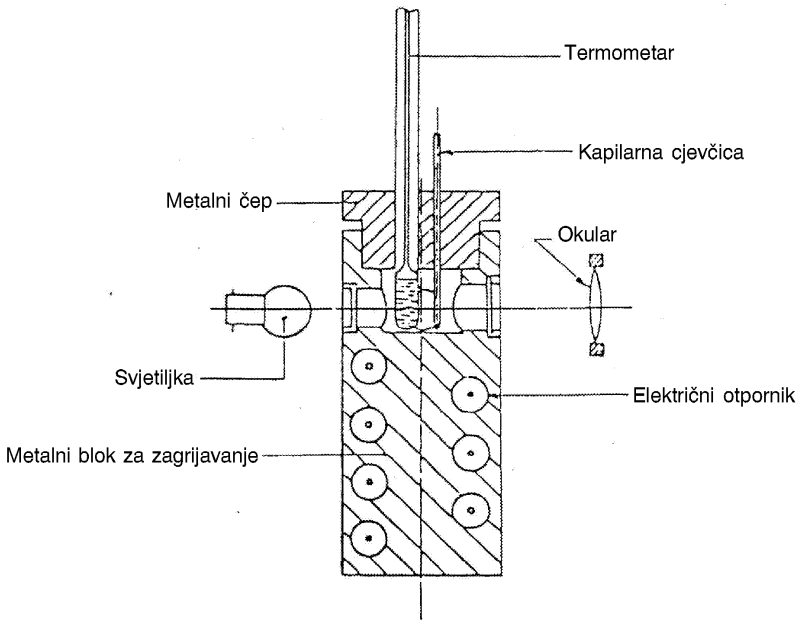
— četiri prozora od termootpornog stakla na bočnim stijenkama komore, međusobno dijametralno raspoređena pod pravim kutem. Ispred jednog od tih prozora ugrađen je okular za promatranje kapilarne cjevčice. Druga tri prozora služe za osvjetljavanje unutrašnjosti kućišta pomoću svjetiljki.

— kapilarna cjevčica od termootpornog stakla zatvorena na jednom kraju (vidjeti 1.6.1.1.).

Termometar:

Vidjeti norme spomenute u 1.6.1.1. Mogu se primijeniti i termoelektrični mjerni uređaji usporedive točnosti.

Slika 3.



1.6.1.3. *Detekcija pomoću fotoćelije*

Uređaj i postupak:

Uređaj se sastoji od metalne komore s automatiziranim sustavom zagrijavanja. Tri kapilare pune se kako je opisano u 1.6.1.1. i postavljaju u peć.

▼B

Kalibracija uređaja postiže se u nekoliko lineranih povećanja temperature, a odgovarajući porast temperature ugađa se na prethodno odabranu stalnu linearnu brzinu, zapisivači pokazuju stvarnu temperaturu peći i temperaturu tvari u kapilarnim cjevčicama.

1.6.2. **Vruće faze**

1.6.2.1. *Koflerov vrući štap*

Vidjeti Dodatak.

1.6.2.2. *Mikroskop za taljenje*

Vidjeti Dodatak.

1.6.2.3. *Metoda meniska (poliamidi)*

Vidjeti Dodatak.

Brzina zagrijavanja u postupku određivanja temperature tališta trebala bi biti manja od 1 K/min.

1.6.3. **Metode za određivanje temperature skrućivanja**

Vidjeti Dodatak.

1.6.4. **Termička analiza**

1.6.4.1. *Diferencijalna termička analiza*

Vidjeti Dodatak.

1.6.4.2. *Diferencijalna pretražna kalorimetrija*

Vidjeti Dodatak.

1.6.5. **Određivanje točke stinjavanja**

Vidjeti Dodatak.

2. **PODACI**

U nekim slučajevima potrebna je korekcija termometra.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— primijenjena metoda,

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće) i prethodne mjere pročišćivanja ako su poduzete,

— procjena točnosti.

Kao temperatura taljenja u izvješću se navodi srednja vrijednost najmanje dvije izmjere koje se nalaze u području procijenjene točnosti.

▼B

Ako je razlika između temperatura u početnoj i konačnoj fazi taljenja unutar granica točnosti metode, temperatura u konačnoj fazi uzima se kao temperatura taljenja; u protivnom u izvješću se navode obje temperature.

Ako se tvar razloži ili sublimira prije nego je postignuta temperatura taljenja, u izvješće se unosi temperatura na kojoj je taj učinak opažen.

U izvješće treba unijeti sve podatke i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje tvari.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, str. 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, str. 505-515.

▼B

Dodatak

Dodatne tehničke pojedinosti moguće je naći npr. u sljedećim normama:

1. **Metode kapilara**

1.1. Uređaj za određivanje temperature taljenja u kupki

ASTM E 324–69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfarehn
JIS K 00–64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Uređaj za određivanje temperature taljenja u metalnom bloku

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

2. **Vruće faze**

2.1. Koflerov vrući štap

ANSI/ASTM D 3451–76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Mikroskop za taljenje

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Metoda meniska (poliamidi)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

▼B

ANSI/ASTM D 2133–66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51–050	Resines de polyamides. Détermination du „point de fusion” méthode du menisque

3. **Metode određivanja temperature skrućivanja**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60–114	Point de fusion des paraffines
NF T 20–051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termička analiza**

4.1. Diferencijalna termička analiza

ASTM E 537–76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473–85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472–86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

ASTM E 537–76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473–85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472–86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Određivanje točke stinjavanja**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B

A.2. TEMPERATURA VRENJA

1. METODA

Većina opisanih metoda zasniva se na Smjernici za ispitivanje OECD-a (1). Temeljna načela navedena su u referencama (2) i (3).

1.1. UVOD

Ovdje opisane metode i uređaji mogu se primijeniti na tekućine i tvari s niskim talištem, pod uvjetom da kod njih ne dolazi do kemijske reakcije ispod temperature vrenja (na primjer: auto-oksidacija, premještanje grupa, degradacija itd.). Metode se mogu primijeniti na čiste i nečiste tekuće tvari.

Naglasak se stavlja na metode kod kojih se primjenjuje detekcija pomoću fotoćelije i termičke analize jer te metode omogućuju određivanje ne samo temperatura taljenja nego i temperatura vrenja. Osim toga, mjerenja se mogu obavljati automatski.

Prednost „dinamičke metode" je i u tome što pruža mogućnost određivanja tlaka pare bez nužne korekcije temperature vrenja prema standardnom tlaku (101,325 kPa) jer se standardan tlak tijekom mjerenja može održavati pomoću manostata.

Napomene:

Utjecaj nečistoća na određivanje temperature vrenja uvelike ovisi o naravi nečistoće. Ako u uzorku postoje hlapljive nečistoće, što bi moglo utjecati na rezultat, tvar se može pročistiti.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Standardna temperatura vrenja definira se kao temperatura kod koje je tlak pare tekućine 101,325 kPa.

Ako se temperatura vrenja ne mjeri kod standardnog atmosferskog tlaka, zavisnost tlaka pare o temperaturi može se opisati Clausius-Clapeyronovom jednadžbom:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3RT} + konst.$$

gdje je:

p = tlak pare tvari u paskalima

ΔH_v = njezina toplina isparavanja u J mol^{-1}

R = univerzalna molarna plinska konstanta = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamička temperatura u K

Temperatura vrenja iskazuje se s obzirom na tlak okoline tijekom mjerenja.

▼B

Pretvaranje jedinica

Tlak (jedinice: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 Mpa

(„bar” je još dozvoljen, ali se ne preporuča)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(jedinice „mm Hg” i „Torr” nisu dozvoljene)

1 atm = standardna atmosfera = 101 325 Pa

(jedinica „atm” nije dozvoljena)

Temperatura (jedinice: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura u Celzijusima, stupanj Celzijusa (°C)

T: Termodinamička temperatura, kelvin (K)

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari nije potrebno rabiti kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

Neke tvari za kalibraciju mogu se pronaći u metodama navedenim u Dodatku.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Pet metoda za određivanje temperature vrenja (područja vrenja) temelji se na mjerenju temperature vrenja, preostale dvije temelje se na termičkoj analizi.

1.4.1. **Određivanje pomoću ebuliometra**

Ebuliometri su prvobitno konstruirani za određivanje molekulske težine podizanjem temperature vrenja, ali su prikladni i za točna mjerenja temperature vrenja. Vrlo jednostavan uređaj opisan je u normi ASTM D 1120-72 (vidjeti Dodatak). U tom uređaju tekućina se zagrijava u uvjetima ravnoteže kod atmosferskog tlaka dok ne zavri.

1.4.2. **Dinamička metoda**

Ova se metoda zasniva na mjerenju temperature na kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare, pomoću odgovarajućeg termometra u refluksu za vrijeme vrenja. U ovoj metodi tlak se može mijenjati.

1.4.3. **Određivanje temperature vrenja metodom destilacije**

Ova se metoda zasniva na destilaciji tekućine i mjerenju temperature na kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare, te određivanju količine destilata.

▼B

1.4.4. **Metoda prema Siwoloboffu**

Uzorak se zagrijava u epruveti koja je uronjena u tekućinu toplinske kupke. Zataljena kapilarna cjevčica, koja ima zračni mjehurić u donjem dijelu, uroni se u epruvetu s uzorkom.

1.4.5. **Detekcija fotoćelijom**

Primjenjujući načelo prema Siwoloboffu, automatsko foto-električno mjerenje vrši se pomoću mjehurića koji se dižu.

1.4.6. **Diferencijalna termička analiza**

Ovom se tehnikom bilježi razlika između temperature tvari i temperature referentnog materijala kao funkcije temperature, dok su tvar i referentni materijal podvrgnuti istom kontroliranom temperaturnom programu. Kad na uzorku dođe do prijelaza koji obuhvaća promjenu entalpije, ta se promjena pokazuje endotermnim odstupanjem (vrenje) od osnovne crte zabilježene temperature.

1.4.7. **Diferencijalna pretražna kalorimetrija**

Ovom se tehnikom bilježi razlika između ulaza energije u tvar i u referentni materijal, kao funkcije temperature, dok su tvar i referentni materijal podvrgnuti istom kontroliranom temperaturnom programu. Ta energija predstavlja energiju koja je potrebna kako bi se između tvari i referentnog materijala postigla nulta temperaturna razlika. Kad na uzorku dođe do prijelaza koji obuhvaća promjenu entalpije, ta se promjena pokazuje endotermnim odstupanjem (vrenje) od osnovne crte zabilježenog protoka topline.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Primjenljivost i točnost različitih metoda koje se rabe za određivanje temperature vrenja/područja vrenja navedene su u tablici 1.

Tablica 1.:

Usporedba metoda

Metoda mjerenja	Procijenjena točnost	Postojeća norma
Ebuliometar	± 1,4 K (do 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dinamička metoda	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Postupak destilacije (područje vrenja)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Prema Siwoloboffu	± 2 K (do 600 K) (2)	
Detekcija pomoću fotoćelije	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Diferencijalna termička kalorimetrija	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferencijalna pretražna kalorimetrija	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Ova točnost vrijedi samo za jednostavan uređaj kakav je, primjerice, opisan u normi ASTM D 1120-72; može se povećati složenijim uređajima s ebuliometrom.
(2) Važi samo za čiste tvari. Uporabu u drugim slučajevima treba posebno opravdati.

▼B

1.6. OPIS METODA

Postupci nekih ispitnih metoda opisani su u međunarodnim i nacionalnim normama (vidjeti Dodatak).

1.6.1. **Ebuliometar**

Vidjeti Dodatak.

1.6.2. **Dinamička metoda**

Vidjeti ispitnu metodu A.4. za određivanje tlaka pare.

Bilježi se temperatura vrenja koja se opaža kod primijenjenog tlaka od 101,325 kPa.

1.6.3. **Postupak destilacije (područje vrenja)**

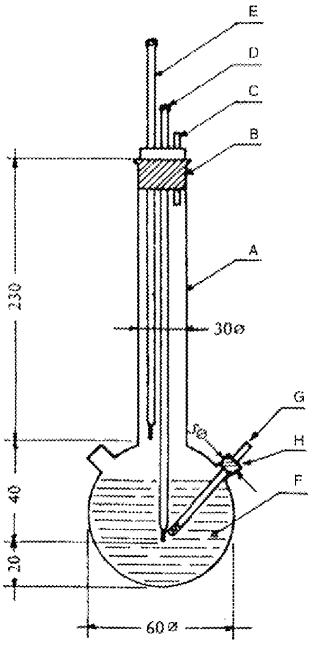
Vidjeti Dodatak.

1.6.4. **Metoda prema Siwoloboffu**

Uzorak se zagrijava u uređaju za mjerenje temperature taljenja u epruveti promjera približno 5 mm (Slika 1.).

Slika 1. prikazuje tip standardiziranog uređaja za određivanje temperature taljenja i vrenja (izrađenog od stakla, sve dimenzije izražene su u milimetrima).

Slika 1.



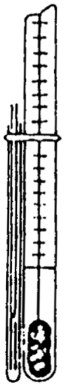
A: Mjerna posuda
B: Zatvarač
C: Odzračnik
D: Termometar
E: Pomoćni termometar
F: Tekućina kupke
G: Epruveta s uzorkom, promjera najviše 5 mm; sadrži kapilarnu cjevčicu, približne duljine 100 mm, unutrašnjeg promjera približno 1 mm i debljine stijenke približno od 0,2 do 0,3 mm
H: Bočna cijev

Kapilarna cjevčica (kapilara za određivanje vrelišta), zataljena oko 1 cm iznad donjeg kraja, stavlja se u epruvetu s uzorkom. Ispitivana tvar dodaje se do razine na kojoj je zataljeni dio kapilare ispod površine tekućine. Epruveta s uzorkom koja sadrži kapilaru za određivanje vrelišta pričvršćena je za termometar gumenom trakom ili je učvršćena pomoću bočnog nosača (vidjeti sliku 2).

▼B

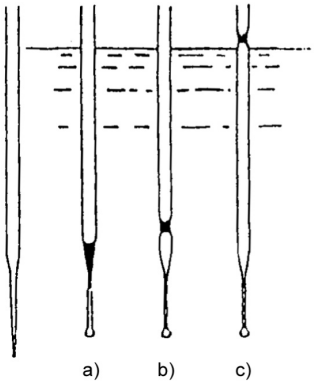
Slika 2.

Načelo prema Siwoloboffu



Slika 3.

Izmijenjeno načelo



Tekućina kupke odabire se prema temperaturi vrenja. Na temperaturama do 573 K, može se koristiti silikonsko ulje. Tekući parafin može se koristiti do 473 K. Tekućina u posudi zagrijava se na način da temperatura najprije raste otprilike 3 K/min. Tekućinu treba miješati. Na oko 10 K ispod očekivane temperature vrenja zagrijavanje se smanjuje na način da temperatura raste brzinom manjom od 1 K/min. Približavanjem temperaturi vrenja, iz kapilare za određivanje vrelišta brzo počinju izlaziti mjehurići.

Temperatura vrenja je temperatura na kojoj se, kod momentalnog hlađenja, niz mjehurića zaustavlja, a tekućina u kapilari naglo počinje rasti. Odgovarajuće očitanje na termometru temperatura je vrelišta dotične tvari.

Kod izmijenjenog načela (Slika 3.), temperatura vrenja određuje se u kapilari za određivanje temperature taljenja. Kapilara je izdužena u tanki vrh duljine oko 2 cm (a) i u nju se usisa mala količina uzorka. Otvoreni kraj te kapilare zatvara se kad dođe do taljenja na način da se na kraju stvara mali zračni mjehurić. Tijekom zagrijavanja u uređaju za mjerenje temperature taljenja (b), zračni se mjehurić širi. Temperatura vrenja odgovara temperaturi kod koje uzorak tvari dostiže razinu površine tekućine kupke (c).

1.6.5. **Detekcija pomoću fotoćelije**

Uzorak se zagrijava u kapilarnoj cjevčici unutar zagrijavanog metalnog bloka.

Zraka svjetlosti usmjerava se odgovarajućim otvorima u bloku kroz tvar na precizno kalibriranu fotoćeliju.

Tijekom porasta temperature uzorka pojedinačni mjehurići zraka izlaze iz kapilare za određivanje vrelišta. Kad je dostignuta temperatura vrenja, broj mjehurića jako se poveća. To uzrokuje promjenu jakosti svjetla koju bilježi fotoćelija i šalje signal za zaustavljanje pokazivaču na kojem se očitava temperatura na otporničkom termometru s platinom koji se nalazi u bloku.

Ova je metoda posebno korisna jer omogućuje određivanje temperatura od sobne temperature prema dolje sve do 253,15 K (- 20 °C) bez ikakvih izmjena na uređaju. Uređaj samo treba uroniti u posudu za hlađenje.

▼B

1.6.6. **Termička analiza**

1.6.6.1. *Diferencijalna termička analiza*

Vidjeti Dodatak.

1.6.6.2. *Diferencijalna pretražna kalorimetrija*

Vidjeti Dodatak.

2. **PODACI**

Kod malih odstupanja od standardnog tlaka (maksimalno ± 5 kPa), temperature vrenja normaliziraju se na T_n pomoću sljedeće jednadžbe Sidneya Younga:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

gdje je:

Δp = (101,325 – p) (obratiti pozornost na znak)

P = izmjereni tlak u kPa

f_T = brzina promjene temperature vrenja u zavisnosti od tlaka u K/kPa

T = izmjerena temperatura vrenja u K

T_n = temperatura vrenja ispravljena na standardni tlak u K

Za mnoge tvari, faktori korekcije temperature, f_T, i jednadžbe za njihovo usklađivanje obuhvaćene su gore navedenim međunarodnim i nacionalnim normama.

Na primjer, u metodi prema normi DIN 53171 spominju se sljedeće grube korekcije za otapala koja su sadržana u bojama:

Tablica 2.

Faktori korekcije temperature f_T

Temperatura T (K)	Korektivni faktor f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— primijenjena metoda,

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće) i prethodne mjere pročišćavanja ako su poduzete,

— procjena točnosti.

Kao temperatura vrenja u izvješću se navodi srednja vrijednost najmanje dvije izmjere koje se nalaze u području procijenjene točnosti (vidjeti tablicu 1.).

Treba navesti izmjerene temperature vrenja i njihovu srednju vrijednost, a podatke o tlaku ili tlakovima kod kojih su mjerenja izvršena navesti u kPa. Tlak bi trebao biti blizak standardnom atmosferskom tlaku.

U izvješće treba unijeti sve podatke i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje tvari.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Dodatak

Dodatne tehničke pojedinosti moguće je naći npr. u sljedećim normama:

1. **Ebuliometar**

1.1. Uređaji za mjerenje temperature taljenja u kupki

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Postupak destilacije (područje vrenja)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferencijalna termička analiza i diferencijalna pretražna kalorimetrija**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3. RELATIVNA GUSTOĆA

1. METODA

Opisane metode zasnivaju se na Smjernici za ispitivanje OECD-a (1). Temeljna načela navedena su u referenci (2).

1.1. UVOD

Opisane metode za određivanje relativne gustoće mogu se koristiti za krute i za tekuće tvari, bez ikakvih ograničenja s obzirom na stupanj njihove čistoće. Rabe se različite metode navedene u tablici 1.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Relativna gustoća D^{20}_4 krutina ili tekućina omjer je mase volumena tvari koja se ispituje, određene na 20 °C, i mase istog volumena vode, određene na 4 °C. Relativna gustoća nema jedinice.

Gustoća, ρ, neke tvari kvocijent je mase, m, i njezinog volumena, v.

Gustoća, ρ, u SI mjernom sustavu iskazuje se u kg/m^3.

1.3. REFERENTNE TVARI (1)(3)

Referentne tvari nije potrebno rabiti kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

1.4. NAČELO METODA

Koriste se četiri kategorije metoda.

1.4.1. **Metode uzgona**

1.4.1.1. *Hidrometar (za tekuće tvari)*

Zadovoljavajuće točno i brzo određivanje gustoće može se postići plutajućim hidrometrima, pomoću kojih se gustoća neke tekućine može utvrditi prema dubini uranjanja očitanjem na stupnjevanoj ljestvici.

1.4.1.2. *Hidrostatska vaga (za tekuće i krute tvari)*

Za određivanje gustoće uzorka može se iskoristiti razlika između težine ispitivanog uzorka mjerene na zraku i u odgovarajućoj tekućini (npr. vodi).

Za krutine, izmjerena gustoća reprezentativna je samo za određeni uzorak koji je korišten. Za određivanje gustoće tekućina, tijelo poznatog volumena, v, važe se prvo na zraku, a zatim u tekućini.

1.4.1.3. *Metoda uranjanja tijela (za tekuće tvari) (4)*

U ovoj metodi, gustoća tekućine određuje se iz razlike između rezultata vaganja tekućine prije i nakon uranjanja tijela poznatog volumena u tekućinu koja se ispituje.

▼B

1.4.2. **Metode pomoću piknometra**

Za krutine ili tekućine mogu se koristiti piknometri raznih oblika i poznatih volumena.

Gustoća se izračunava iz razlike u težini punog i praznog piknometra i njegovog poznatog volumena.

1.4.3. **Usporedba sa zrakom pomoću piknometra (za krutine)**

Gustoća krutine u bilo kojem obliku može se mjeriti na sobnoj temperaturi usporedbom plinova piknometrom. Volumen tvari mjeri se na zraku ili u inertnom plinu u cilindru varijabilnog kalibriranog volumena. Za izračun gustoće uzima se jedno mjerenje mase nakon završetka mjerenja volumena.

1.4.4. **Oscilirajući denzitometar (5)(6)(7)**

Gustoća tekućine može se izmjeriti oscilirajućim denzitometrom. Mehanički oscilator konstruiran u obliku U-cijevi vibrira rezonantnom frekvencijom oscilatora koja ovisi o njegovoj masi. Uvođenjem uzorka mijenja se rezonantna frekvencija oscilatora. Uređaj mora biti kalibriran pomoću dvije tekućine poznatih gustoća. Poželjno je odabrati tvari čije su gustoće u rasponu područja koje se mjeri.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Primjenljivost različitih metoda koje se rabe za određivanje relativne gustoće navedene su u tablici.

1.6. OPIS METODA

Norme koje se navode kao primjeri, u kojima se mogu pronaći dodatne tehničke pojedinosti, navedene su u Dodatku.

Ispitivanja treba provoditi na 20 °C, uz najmanje dva mjerenja.

2. **PODACI**

Vidjeti norme.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— primijenjena metoda,

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće) i prethodne mjere pročišćivanja ako su poduzete.

Relativna gustoća D_4^{20} u izvješću se bilježi kako je utvrđeno u 1.2., zajedno s fizikalnim stanjem mjerene tvari.

U izvješće treba unijeti sve informacije i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje tvari.

▼B

Tablica:

Primjenljivost metoda

Metoda mjerenja	Gustoća		Najveći mogući dinamički viskozitet	Postojeće norme
	krutina	tekućina		
1.4.1.1. Hidrometar		da	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatska vaga				
(a) krutine	da			ISO 1183 (A)
(b) tekućine		da	5 Pa s	ISO 901 i 758
1.4.1.3. Metoda uranjanja tijela		da	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometar				ISO 3507
(a) krutine	da			ISO 1183 (B), NF T 20-053
(b) tekućine		da	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Usporedba sa zrakom - piknometar	da			DIN 55990 dio 3. DIN 53243
1.4.4. Oscilirajući denzitometar		da	5 Pa s	

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Testing Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, str. 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.ll, str. 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, str. 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen -Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, str. 717 -726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, str. 253-255.

▼B

Dodatak

Dodatne tehničke pojedinosti moguće je naći npr. u sljedećim normama:

1. **Metode uzgona**

1.1. Hidrometar

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hidrostatska vaga

Za krute tvari

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Za tekuće tvari

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 i ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metoda uronjenog tijela

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Metode piknometrom**

2.1. Za tekuće tvari

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00. 10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00. 10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of min eral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2. Za krute tvari

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solidsin powder and liquids – Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Usporedba sa zrakom pomoću piknometra**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. TLAK PARE

1. METODA

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG 104 (2004.).

1.1. UVOD

Ova izmijenjena verzija metode A 4. (1.) sadrži i jednu dodatnu metodu: „Metoda efuzije: izotermalna termogravimetrija”, koja je namijenjena tvarima s vrlo niskim tlakom (do 10^{-10} Pa). U svjetlu potreba za postupcima, posebno kad je u pitanju određivanje tlaka pare za tvari s niskim tlakom pare, ponovno se ocjenjuju i drugi postupci u okviru ove metode u odnosu na druga područja primjene.

U termodinamičkoj ravnoteži tlak pare čiste tvari ovisi samo o temperaturi. Temeljna načela opisana su na drugom mjestu (2.) (3.).

Ne postoji jedinstveni mjerni postupak koji bi se mogao primijeniti na cjelokupno područje tlakova para, koji se mogu kretati od ispod 10^{-10} sve do 10^5 Pa. Ova metoda obuhvaća osam metoda za mjerenje tlaka pare koje se mogu primijeniti u različitim područjima tlaka pare. U tablici 1. dana je usporedba različitih metoda s obzirom na primjenu i mjerno područje. Te se metode mogu primijeniti samo na spojeve koji se ne razgrađuju u uvjetima ispitivanja. Ako se tlak pare iz tehničkih razloga ne može odrediti nekom od navedenih pokusnih metoda, on se može i procijeniti; preporučena metoda procjene utvrđena je u Dodatku.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Tlak pare tvari definira se kao tlak zasićenja iznad krute ili tekuće tvari.

Koristi se SI jedinica za tlak, paskal (Pa). U nastavku su navedene i druge jedinice koje su se koristile u prošlosti, zajedno s faktorima pretvorbe:

1 torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

Jedinica za temperaturu u SI sustavu je kelvin (K). Za pretvorbu Celzijevih stupnjeva u kelvine koristi se sljedeća formula:

$$T = t + 273{,}15$$

gdje je T temperatura u kelvinima ili termodinamička temperatura, a t je Celzijeva temperatura.

▼**M1**

Tablica 1.

Mjerna metoda	Tvari		Procijenjena ponovljivost	Procijenjena reproducibilnost	Preporučeno područje
	Kruta tvar	Tekućina			
Dinamička metoda	nisko talište	da	do 25 % od 1 do 5 %	do 25 % od 1 do 5 %	od 10^3 Pa do 2×10^3 Pa od 2×10^3 Pa do 10^5 Pa
Statička metoda	da	da	od 5 do 10 %	od 5 do 10 %	od 10 Pa do 10^5 Pa od 10^{-2} Pa do 10^5 Pa (1)
Metoda s izoteniskopom	da	da	od 5 do 10 %	od 5 do 10 %	od 10^2 Pa do 10^5 Pa
Metoda efuzije: vaganje tlaka pare	da	da	od 5 do 20 %	do 50 %	od 10^{-3} do 1 Pa
Metoda efuzije: Knudsenova ćelija	da	da	od 10 do 30 %	—	od 10^{-10} do 1 Pa
Metoda efuzije: izotermalna termogravimetrija	da	da	od 5 do 30 %	do 50 %	od 10^{-10} do 1 Pa
Metoda zasićenja plina	da	da	od 10 do 30 %	do 50 %	od 10^{-10} do 10^3 Pa
Metoda vrtećeg rotora	da	da	od 10 do 20 %	—	od 10^{-4} do 0,5 Pa

(1) Ako se koristi kapacitivni manometar.

1.3. NAČELO ISPITIVANJA

Tlak pare uglavnom se određuje pri različitim temperaturama. U ograničenom temperaturnom području, logaritam tlaka pare čiste tvari linearna je funkcija recipročne termodinamičke temperature, u skladu s pojednostavljenom Clapeyron-Clasiusovom jednadžbom:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3\ RT} + konst.$$

gdje je:

p = tlak pare u paskalima

ΔH_v = toplina isparavanja u J mol^{-1}

R = univerzalna plinska konstanta, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura u K

▼**M1**

1.4. REFERENTNE TVARI

Uporaba referentnih tvari nije obvezna. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode te omogućuju usporedbu rezultata različitih metoda.

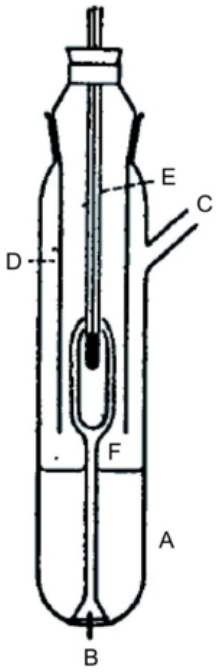
1.5. OPIS METODE

1.5.1. **Dinamička metoda (Cottrellova metoda)**

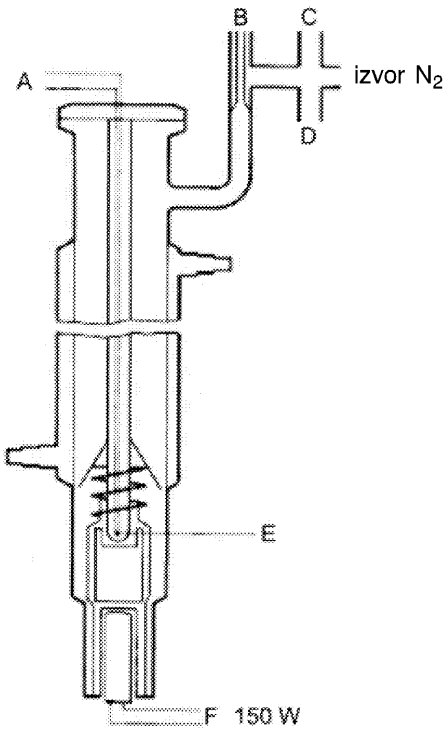
1.5.1.1. *Načelo*

Tlak pare određuje se mjerenjem temperature vrenja tvari pri različitim zadanim tlakovima između cca 10^3 i 10^5 Pa. Ova se metoda preporučuje i za određivanje temperature vrenja. U tu se svrhu može koristiti do temperature od 600 K. Temperature vrenja tekućina su za približno 0,1 °C više na dubini od 3 do 4 cm nego na površini zbog hidrostatskog tlaka stupca tekućine. Kod Cottrellove metode (4.) termometar se nalazi u pari iznad površine tekućine, a uzavrela se tekućina neprekidno pumpa preko glave termometra. Glava termometra prekrivena je tankim slojem tekućine koja je u ravnoteži s parom pri atmosferskom tlaku. Termometar stoga pokazuje stvarno vrelište bez grešaka zbog pregrijavanja i hidrostatskog tlaka. Izvorna Cottrellova crpka prikazana je na slici 1. Cijev A sadrži uzavrelu tekućinu. U dno je utisnuta platinasta žica B, koja pospješuje ravnomjerno vrenje. Bočna cjevčica C vodi do kondenzatora, dok plašt D onemogućuje da hladni kondenzat dođe do termometra E. Kad tekućina u A vrije, mjehurići i tekućina koji dospiju u lijevak prolaze kroz krakove crpke F i prelijevaju se preko tijela termometra.

Slika 1.



Slika 2.



▼**M1**

Cottrellova crpka (4.)

A: Termopar

B: Vakuumski pufer-volumen

C: Mjerač tlaka

D: Vakuum

E: Mjerna točka

F: Grijaći element cca 150 W

1.5.1.2. *Aparatura*

Na slici 2. prikazana je vrlo točna aparatura koja radi prema Cottrellovom načelu. Ona se sastoji od cijevi s prostorom za vrenje u donjem dijelu, hladilom u srednjem dijelu i ispustom i prirubnicom u gornjem dijelu. Cottrellova je crpka smještena u prostoru za vrenje koji se zagrijava električnom grijačem. Temperatura se mjeri termoparom s plaštem ili otporničkim termometrom, koji se umetne kroz prirubnicu na vrhu. Ispust je spojen na sustav regulacije tlaka. On se sastoji od vakuumske crpke, puferskog volumena, manostata za podešavanje dotoka dušika za regulaciju tlaka i manometra.

1.5.1.3. *Postupak*

Tvar se stavi u prostor za vrenje. Određeni se problemi mogu javiti u slučaju kad krute tvari nisu praškaste, ali to je ponekad moguće riješiti zagrijavanjem rashladnog plašta. Aparatura se zabrtvi kod prirubnice i tvar odzračuje. Ovom se metodom ne mogu mjeriti tvari koje se pjene.

Zatim se podesi najniži željeni tlak i uključi zagrijavanje. Istovremeno se temperaturni senzor priključi na pisač.

Ravnoteža je postignuta kad se pri stalnom tlaku bilježi stalna temperatura vrenja. Osobito je važno paziti da se izbjegne burno vrenje („bumping”). Osim toga, na hladilu mora doći do potpune kondenzacije. Kod određivanja tlaka pare krutih tvari s niskim talištem treba voditi računa da ne dođe do začepljenja kondenzatora.

Kad se zabilježi točka ravnoteže, namjesti se viši tlak. Postupak se nastavlja na isti način dok se ne dođe do 10^5 Pa (sveukupno približno 5 do 10 mjernih točaka). Za provjeru, točke ravnoteže treba ponoviti pri padajućem tlaku.

1.5.2. **Statička metoda**

1.5.2.1. *Načelo*

Kod statičke metode (5.) tlak pare određuje se u termodinamičkoj ravnoteži pri zadanoj temperaturi. Ova je metoda prikladna za tvari i za višekomponentne tekućine i krute materijale u području od 10^{-1} do 10^5 Pa, a uz poseban oprez, i u području od 1 do 10 Pa.

▼**M1**

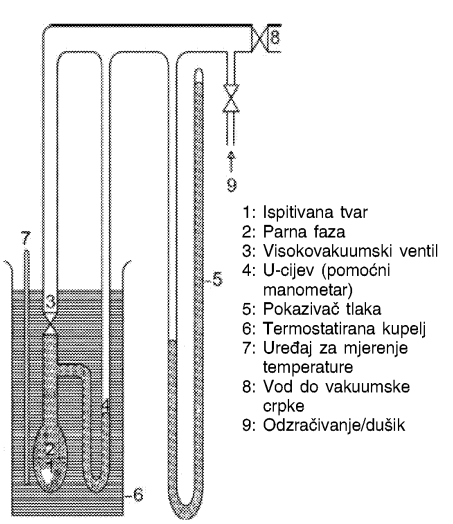
1.5.2.2. *Aparatura*

Oprema se sastoji od kupelji sa stalnom temperaturom (preciznost ± 0,2 K), posude za uzorak spojene s vakuumskom cijevi, manometra i sustava za regulaciju tlaka. Komora s uzorkom (slika 3.a) spojena je s vakuumskom cijevi preko ventila i diferencijalnog manometra (U-cijev koja sadrži prikladnu manometarsku tekućinu) koji služi kao nulti pokazivač. U diferencijalnom manometru mogu se koristiti živa, silikoni i ftalati, ovisno o području tlaka i kemijskim svojstvima ispitivane tvari. Ipak, s obzirom na štetnost za okoliš, uporabu žive treba izbjegavati kad god je to moguće. Ispitivana tvar ne smije se primjetno otapati u tekućini U-cijevi niti s njom reagirati. Umjesto U-cijevi može se koristiti mjerač tlaka (slika 3.b). Živa se u manometru može koristiti u području od normalnog tlaka do 10^2 Pa, dok su silikonske tekućine i ftalati prikladni za tlakove ispod 10^2 Pa do 10 Pa. Postoje i drugi uređaji za mjerenje tlaka koji se mogu koristiti i ispod 10^2 Pa, a membranski kapacitativni manometri prikladni za zagrijavanje mogu se koristiti čak i ispod 10^{-1}. Temperatura se mjeri na vanjskoj stijenki posude s uzorkom ili u samoj posudi.

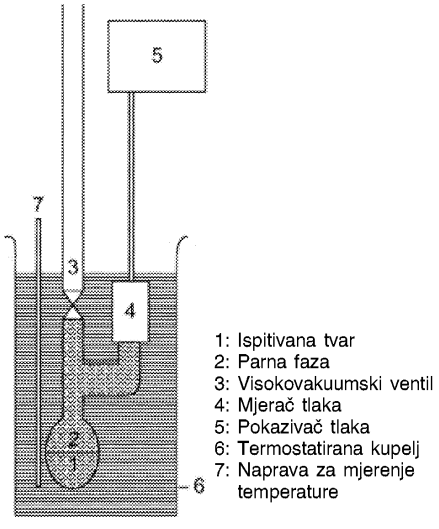
1.5.2.3. *Postupak*

Koristeći aparaturu prikazanu na slici 3.a, U-cijev napuni se odabranom tekućinom koja se prije očitavanja vrijednosti mora odzračiti na povišenoj temperaturi. Ispitivana tvar se stavi u aparaturu i odzrači na sniženoj temperaturi. U slučaju višekomponentnih uzoraka temperatura mora biti dovoljno niska da ne dođe do promjene sastava materijala. Uspostava ravnoteže se može ubrzati miješanjem. Uzorak se može ohladiti tekućim dušikom ili suhim ledom, ali treba paziti da ne dođe do kondenzacije zraka ili tekućine u crpki. Otvori se ventil iznad posude s uzorkom i nekoliko minuta provodi usisavanje kako bi se uklonio zrak. Postupak odzračivanja se prema potrebi ponovi više puta.

Slika 3.a



Slika 3.b



▼M1

Kad se uzorak zagrijava sa zatvorenim ventilom, tlak pare se povećava. To mijenja ravnotežu tekućine u U-cijevi. Da bi se povratila ravnoteža, u aparaturu se dovodi dušik ili zrak dok se pokazivač diferencijalnog tlaka ne vrati na ništicu. Tlak koji je za to potreban može se očitati na manometru ili na preciznijem instrumentu. Taj tlak odgovara tlaku pare tvari na temperaturi mjerenja. Ako se koristi aparatura opisana na slici 3.b, tlak pare može se izravno očitati.

Tlak pare određuje se u odgovarajuće malim temperaturnim intervalima (sveukupno približno 5 do 10 mjernih točaka) do željene maksimalne temperature.

Za provjeru treba ponoviti mjerenja na niskim temperaturama. Ako se vrijednosti dobivene pri ponovljenom mjerenju ne podudaraju s krivuljom za rastuću temperaturu, mogući razlozi su:

i. u uzorku još ima zraka (npr. u slučaju jako viskoznih materijala) ili tvari s niskim vrelištem koje se oslobađaju prilikom zagrijavanja;

ii. tvar kemijski reagira u temperaturnom području koje se ispituje (npr. razlaganje, polimerizacija).

1.5.3. **Metoda s izoteniskopom**

1.5.3.1. *Načelo*

Izoteniskop (6.) se temelji na načelu statičke metode. Kod primjene ove metode uzorak se stavlja u balon sa stalnom temperaturom koji je spojen na manometar i vakuumsku crpku. Nečistoće koje su hlapljivije od tvari uklanjaju se odzračivanjem na sniženom tlaku. Tlak pare uzorka pri odabranim temperaturama izjednačava se s poznatim tlakom inertnog plina. Izoteniskop je prvobitno izrađen za mjerenje tlaka pare nekih tekućih ugljikovodika, ali je prikladan i za ispitivanje krutih tvari. Metoda u pravilu nije prikladna za višekomponentne sustave. Sitne greške u rezultatima moguće su kod uzoraka koji sadrže nehlapljive nečistoće. Preporučeno područje je 10^2 do 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Aparatura*

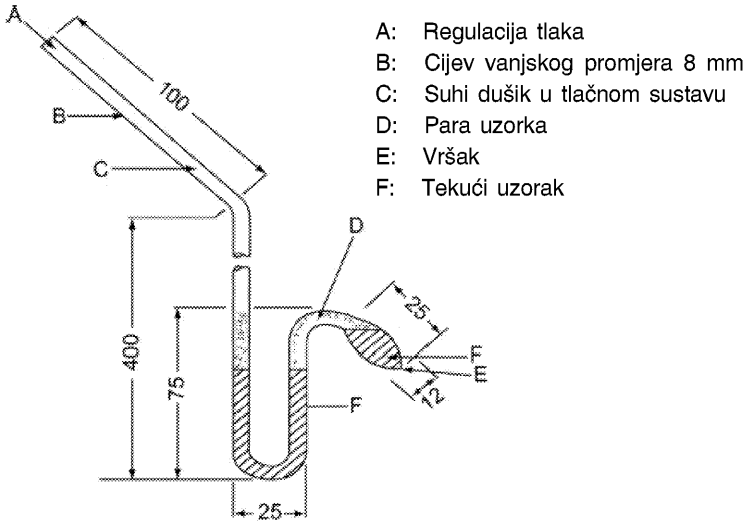
Primjer mjernog uređaja prikazan je na slici 4. Potpun opis može se pronaći u ASTM D 2879-86 (6.).

▼M1

1.5.3.3. *Postupak*

Kad se ispituju tekućine, sama tvar služi kao tekućina diferencijalnog manometra. U izoteniskop stavi se količina tekućine koja je potrebna da se napuni balon i kraći krak manometra. Izoteniskop se priključi na vakuumski sustav kako bi se vakuumirao, a zatim napuni dušikom. Pražnjenje i čišćenje sustava treba dvaput ponoviti kako bi se uklonio preostali kisik. Napunjeni izoteniskop stavi se u vodoravan položaj tako da se uzorak u tankom sloju raširi po balonu i manometru. Tlak sustava se smanji na 133 Pa i uzorak polako zagrijava dok ne zavrije (uklanjanje otopljenih plinova). Izoteniskop se zatim položi tako da se uzorak vrati u balon i napuni kraći krak manometra. Tlak se održava na 133 Pa. Izduženi vrh balona s uzorkom se zagrijava na malom plamenu dok se para koja se oslobađa iz uzorka ne raširi dovoljno da istisne dio uzorka iz gornjeg dijela balona i kraka manometra u manometar, stvarajući prostor ispunjen parom u kojemu nema dušika. Izoteniskop se zatim stavi u kupelj sa stalnom temperaturom i tlak dušika podešava dok se ne izjednači s tlakom pare uzorka. U ravnoteži je tlak dušika jednak tlaku pare tvari.

Slika 4.



(Dimenzije u mm)

Kod krutih tvari koriste se manometarske tekućine kao što su silikonske tekućine ili ftalati, ovisno o područjima tlaka i temperature. Odzračena manometarska tekućina stavi se u proširenje na dužem kraku izoteniskopa. Nakon toga se kruta tvar koja se ispituje stavi u balon za uzorak i odzrači na povišenoj temperaturi. Izoteniskop se zatim nagne tako da manometarska tekućina može otjecati u U-cijev.

▼M1

1.5.4. **Metoda efuzije: vaganje tlaka pare (7.)**

1.5.4.1. *Načelo*

Uzorak ispitivane tvari se zagrije u maloj peći i stavi u vakuumirano zvono. Peć se prekrije poklopcem na kojemu se nalaze male rupice poznatoga promjera. Para tvari koja izlazi kroz jednu od rupica usmjeri se u zdjelicu vrlo osjetljive vage, koja je također smještena u zvonu. Kod nekih je izvedbi zdjelica vage uložena u kućište za hlađenje, koje procesom vođenja topline osigurava rasap topline prema van, i hladi se isijavanjem, tako da se izlazeća para na njoj kondenzira. Moment mlaza pare djeluje kao sila na vagu. Tlak pare može se odrediti na dva načina: izravno iz sile koja djeluje na zdjelicu vage ili iz brzine isparavanja pomoću Hertz-Knudsenove jednadžbe (2.):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

gdje je:

G = brzina isparavanja (kg s^{-1} m^{-2})

M = molarna masa (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = univerzalna plinska konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

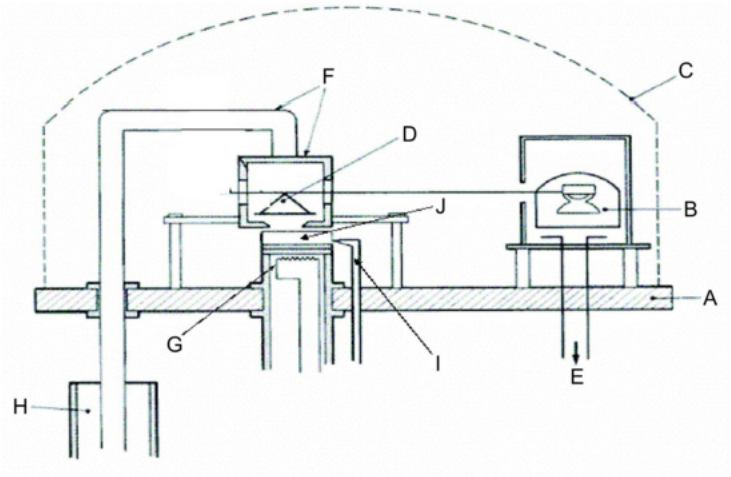
P = tlak pare (Pa)

Preporučeno područje je 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2. *Aparatura*

Opće načelo aparature prikazano je na slici 5.

Slika 5.



A: Postolje

B: Instrument s pomičnom zavojnicom

C: Zvono

D: Vaga sa zdjelicom

E: Vakuumski mjerni uređaj

F: Kućište i palica za hlađenje

G: Peć za isparavanje

H: Dewarova posuda s tekućim dušikom

I: Mjerenje temperature uzorka

J: Ispitivana tvar

▼**M1**

1.5.5. **Metoda efuzije: Knudsenova ćelija**

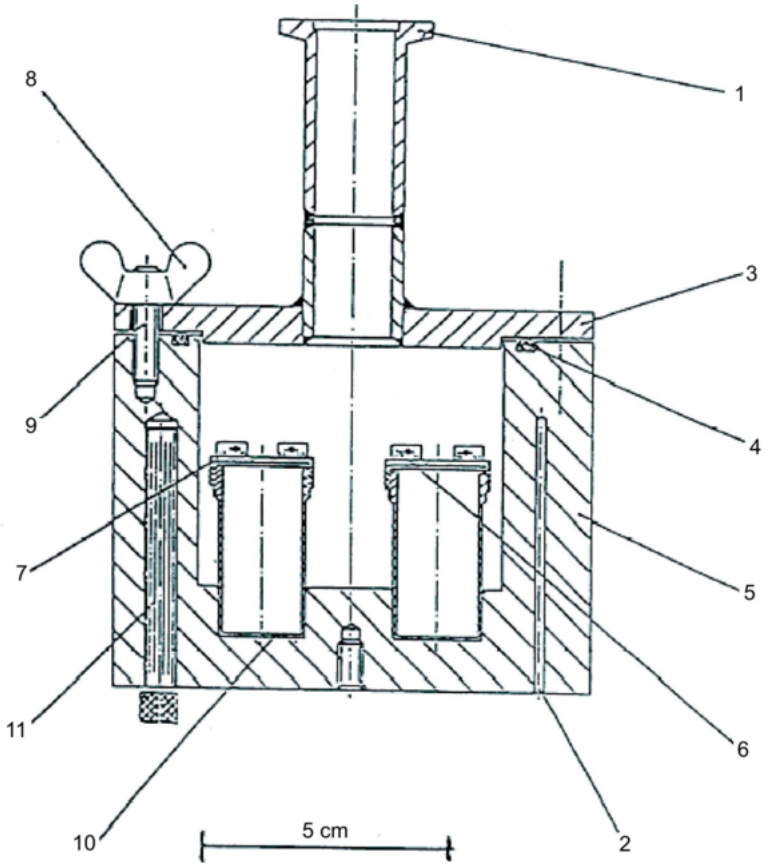
1.5.5.1. *Načelo*

Metoda se temelji na procjeni mase ispitivane tvari koja u obliku pare istječe kroz mikrootvor Knudsenove ćelije (8.) u jedinici vremena u uvjetima ultravakuuma. Masa pare može se dobiti određivanjem gubitka mase ćelije ili kondenzacijom pare na niskoj temperaturi i kromatografskim određivanjem količine tvari koja je prešla u paru. Tlak pare izračunava se primjenom Hertz-Knudsenovog odnosa (vidi odjeljak 1.5.4.1.) uz faktore korekcije koji ovise o parametrima aparature (9.). Preporučeno područje je 10^{-10} do 1 Pa (10.) (11.) (12.) (13.) (14.).

1.5.5.2. *Aparatura*

Opće načelo aparature prikazano je na slici 6.

Slika 6.



1:	Priključak na vakuum	7:	Poklopac na navoj
2:	Otvori platinastog otporničkog termometra ili mjerenje i nadzor temperature	8:	Krilne matice
3:	Poklopac vakuumskog spremnika	9:	Vijci
4:	O-prsten	10:	Efuzijske ćelije od nehrđajućeg čelika
5:	Aluminijski vakuumski spremnik	11:	Grijaća patrona
6:	Uređaj za postavljanje i skidanje efuzijskih ćelija		

▼M1

1.5.6. **Metoda efuzije: izotermalna termogravimetrija**

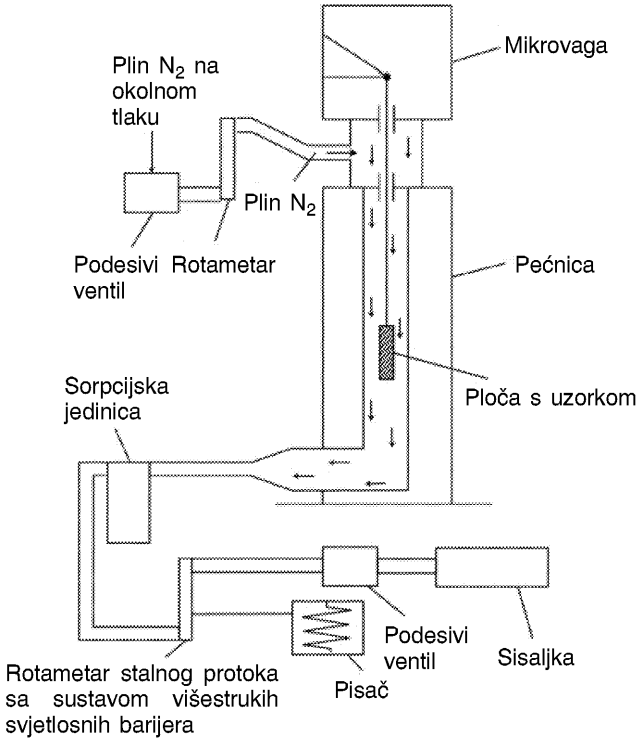
1.5.6.1. *Načelo*

Metoda se temelji na određivanju brzina ubrzanog isparavanja ispitivane tvari pri povišenim temperaturama i okolnom tlaku primjenom termogravimetrije (10.) (15.) (16.) (17.) (18.) (19.) (20.). Brzine isparavanja v_T dobivaju se izlaganjem odabranog spoja atmosferi spore struje inertnog plina i praćenjem gubitka mase pri definiranim izotermalnim temperaturama T u kelvinima u odgovarajućim vremenskim razdobljima. Tlakovi pare p_T izračunavaju se iz vrijednosti v_T na temelju linearnog odnosa između logaritma tlaka pare i logaritma brzine isparavanja. Ako je to potrebno, može se napraviti ekstrapolacija na temperature od 20 i 25 °C regresijskom analizom log p_T u ovisnosti o 1/T. Ova je metoda prikladna za tvari s niskim tlakom pare čak do 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar), s time da čistoća tvari mora biti blizu 100 % kako bi se izbjeglo pogrešno tumačenje izmjerenih gubitaka mase.

1.5.6.2. *Aparatura*

Opće načelo pokusne aparature prikazano je na slici 7.

Slika 7.



Preko nosača uzorka obješenog na mikrovagi u komori s nadziranom temperaturom pušta se struja suhog plinovitog dušika koja sa sobom odnosi molekule pare ispitivane tvari. Plinska struja po izlasku iz komore pročišćava se u sorpcijskoj jedinici.

1.5.6.3. *Postupak*

Ispitivana se tvar homogeno nanese na površinu hrapave staklene ploče. U slučaju krutih tvari, ploča se jednoliko navlaži otopinom tvari u prikladnom otapalu i osuši u inertnoj atmosferi. Kod mjerenja, ploča s premazom objesi se u termogravimetrijski analizator i nakon toga gubitak mase neprekidno mjeri u ovisnosti o vremenu.

▼M1

Brzina isparavanja v_T pri određenoj temperaturi izračunava se iz gubitka mase Δm ploče s uzorkom pomoću sljedeće formule:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}(gcm^{-2}h^{-1})$$

gdje je F površina nanesene ispitivane tvari, u pravilu površina ploče s uzorkom, a t je vrijeme gubitka mase Δm.

Tlak pare p_T izračunava se na temelju funkcije brzine isparavanja v_T:

$$\text{Log } p_T = C + D \cdot \log v_T$$

gdje su C i D specifične konstante pokusne aparature koje su ovisne o promjeru mjerne komore i brzini protoka plina. Te se kostante određuju jedanput mjerenjem niza spojeva poznatog tlaka pare i regresijom log p_T u ovisnosti o log v_T (11.) (21.) (22.).

Odnos između tlaka pare p_T i temperature T u kelvinima proizlazi iz sljedeće formule:

$$\text{Log } p_T = A + B \cdot 1/T$$

gdje su A i B konstante dobivene regresijom log p_T u ovisnosti o 1/T. Uz pomoć ove jednadžbe tlak pare može se ekstrapolirati na bilo koju drugu temperaturu.

1.5.7. **Metoda zasićenja plina (23.)**

1.5.7.1. *Načelo*

Inertni se plin pri sobnoj temperaturi provodi kroz uzorak ispitivane tvari ili prevodi preko njega poznatom brzinom koja mora biti dovoljno niska da se postigne zasićenje. Postizanje zasićenja u plinskoj fazi je od presudne važnosti. Tvar koja putuje s plinom odvaja se uglavnom pomoću sorbensa i određuje njezina količina. Za kvantitativno određivanje prenesenog materijala se umjesto odvajanja pare i naknadne analize mogu koristiti integrirani analitički postupci, kao što je plinska kromatografija. Kod izračunavanja tlaka pare polazi se od pretpostavke da vrijedi zakon o idealnom plinu i da je ukupni tlak smjese plinova jednak zbroju tlakova plinskih komponenti. Parcijalni tlak ispitivane tvari tj. tlak pare izračunava se iz poznatog ukupnog volumena plina i mase prenesenog materijala.

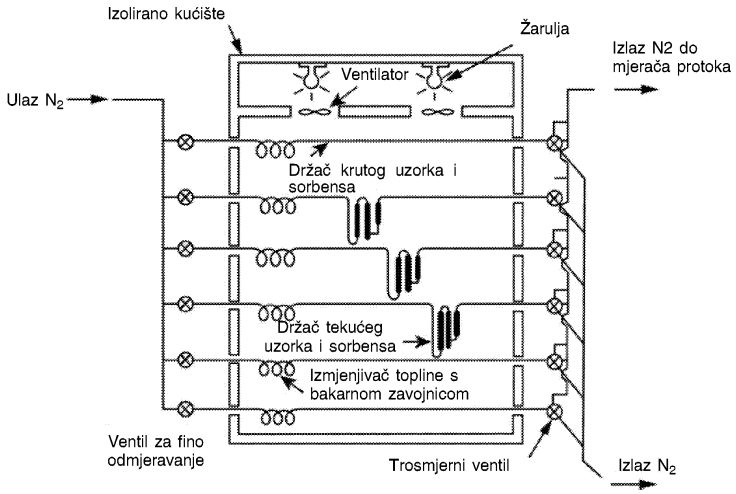
Postupak zasićenja plina može se primijeniti na krute i tekuće tvari. On se može koristiti za tlak pare do najmanje 10^{-10} Pa (10.) (11.) (12.) (13.) (14.). Metoda je najpouzdanija pri tlakovima pare ispod 10^3 Pa. Iznad 10^3 Pa općenito se dobivaju precijenjene vrijednosti tlaka pare, vjerojatno zbog tvorbe aerosola. Budući da se mjerenja tlaka pare provode na sobnoj temperaturi, nema potrebe za ekstrapolacijom podataka od visokih temperatura koja bi mogla dovesti do ozbiljnih grešaka.

1.5.7.2. *Aparatura*

Postupak zahtijeva korištenje kućišta sa stalnom temperaturom. Shema na slici 8. prikazuje kućište u koje su smještena tri držača za krute uzorke i tri držača za tekuće uzorke, što omogućuje istovremenu analizu tri kruta uzorka ili tri tekuća uzorka. Temperatura se održava unutar ± 0,5 °C ili manje.

▼**M1**

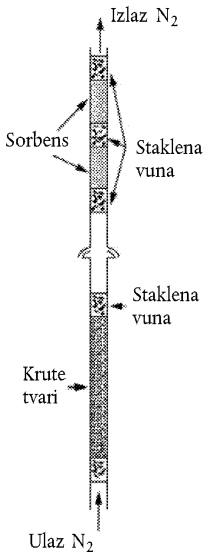
Slika 8.



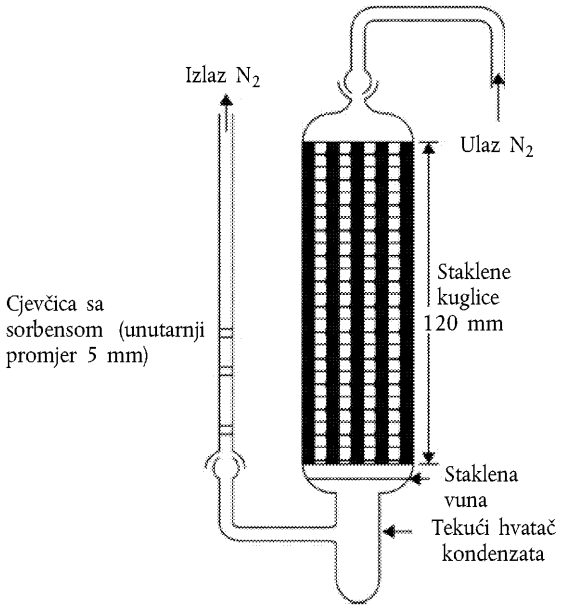
Kao inertni plin nositelj obično se koristi dušik, ali ponekad može biti potreban i neki drugi plin (24.). Plin nositelj mora biti suh. Plinska se struja podijeli u 6 manjih struja koje se reguliraju igličnim ventilima (otvora približno 0,79 mm), i odvodi u kućište bakrenim cijevima unutarnjeg promjera 3,8 mm. Kad se temperatura uravnoteži, plin protječe kroz uzorak i odvajač sa sorbensom te izlazi iz kućišta.

Kruti se uzorci stavljaju u staklenu cjevčicu unutarnjeg promjera 5 mm između čepova od staklene vune (vidi sliku 9.). Na slici 10. prikazan je držač tekućeg uzorka i sustav sorbensa. Najobnovljivije mjerenje tlaka pare tekućina postiže se ako se tekućina nanese na staklene kuglice ili na inertni sorbens, kao što je silikagel, i držač napuni kuglicama. Druga mogućnost je da se plin nositelj prevodi preko grubog metalnog sita i propuhuje kroz kolonu tekuće ispitivane tvari.

Slika 9.



Slika 10.



▼M1

Sustav sorbensa se sastoji od prednjeg i pomoćnog dijela. Pri vrlo niskom tlaku pare, sorbens zadržava tek male količine tvari i adsorpcija na staklenoj vuni i staklenoj cjevčici između uzorka i sorbensa može predstavljati ozbiljan problem.

Odvajači hlađeni krutim CO_2 još su jedan učinkovit način skupljanja isparenog materijala. Oni ne stvaraju protutlak na koloni za zasićenje, a odvojeni se materijal može lako kvantitativno ukloniti.

1.5.7.3. *Postupak*

Brzina protoka izlaznog plina nositelja mjeri se pri sobnoj temperaturi. Tijekom pokusa treba često provjeravati brzinu protoka kako bi se dobila točna vrijednost ukupnog volumena plina nositelja. Poželjno je neprekidno praćenje mjeračem protoka mase. Za zasićenje plinovite faze ponekad je potrebno dugo vrijeme kontakta, a time i prilično male brzine protoka plina (25.).

Na kraju pokusa prednji i pomoćni dio sorbensa zasebno se analiziraju. Spoj se iz svakog dijela desorbira dodavanjem otapala. Nastale se otopine kvantitativno analiziraju radi određivanja desorbirane mase iz svakog dijela. Izbor metode analize (također i izbor sorbensa i desorpcijskog otapala) ovisi o vrsti ispitivanog materijala. Učinkovitost desorpcije određuje se ubrizgavanjem poznate količine uzorka na sorbens, desorbiranjem tvari i analiziranjem dobivene količine. Važno je da se kod provjere učinkovitosti desorpcije koristi koncentracija koja je jednaka ili slična koncentraciji uzorka u ispitnim uvjetima.

Da bi se osiguralo zasićenje plina nositelja ispitivanom tvari, koriste se tri različite brzine protoka plina. Ako se izračunani tlak pare ne mijenja s promjenom brzine protoka, smatra se da je plin zasićen.

Tlak pare izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$p = \frac{m}{V} \times \frac{RT}{M}$$

gdje je:

p = tlak pare (Pa)

m = masa isparene ispitivane tvari (g)

V = volumen zasićenog plina (m^3)

R = univerzalna plinska konstanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = molarna masa ispitivane tvari (g mol^{-1})

Izmjerene volumene treba ispraviti za razliku u tlaku i temperaturi između mjerača protoka i zasićivača.

▼M1

1.5.8. **Metoda vrtećeg rotora**

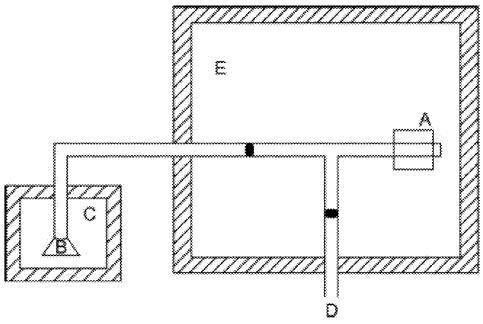
1.5.8.1. *Načelo*

U ovoj se metodi koristi rotirajući viskozimetar čiji se mjerni element sastoji od male čelične kuglice obješene u magnetskom polju koja se vrti pod utjecajem okretnih polja (26.) (27.) (28.). Prijemne zavojnice omogućuju mjerenje brzine vrtnje. Kad kuglica postigne određenu brzinu vrtnje, obično oko 400 okretaja u sekundi, pobuda se prekida i nastupa usporavanje zbog trenja plina. Opadanje brzine vrtnje mjeri se u ovisnosti o vremenu. Tlak pare se izvodi iz usporavanja čelične kuglice, koje ovisi o tlaku. Preporučeno područje je od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparatura*

Raspored pokusne aparature prikazan je na slici 11. Mjerna se glava nalazi u kućištu sa stalnom temperaturom koja se regulira s točnošću od 0,1 °C. Posuda s uzorkom stavi se u zasebno kućište gdje je temperatura također regulirana s točnošću od 0,1 °C. Svi ostali dijelovi aparature se drže na višoj temperaturi kako bi se spriječila kondenzacija. Čitava aparatura je spojena na visokovakuumski sustav.

Slika 11.



A: Rotirajuća senzorska glava
B: Ćelija za uzorak
C: Termostat
D: Vakuumski vod (turbo-crpka)
E: Zračni termostat

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Tlak pare kod svake od prethodnih metoda treba odrediti za najmanje dvije temperature. Poželjno je odabrati tri ili više temperatura u području od 0 do 50 °C kako bi se provjerila linearnost krivulje tlaka pare. U slučaju metode efuzije (Knudsenova ćelija i izotermalna termogravimetrija) i metode zasićenja plina, za mjerenje se umjesto temperaturnog područja od 0 do 50 °C preporučuje područje od 120 do 150 °C.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju sadrži sljedeće informacije:

— primijenjenu metodu,

▼M1

— točnu specifikaciju tvari (identitet i nečistoće) i (prema potrebi) postupak prethodnog pročišćavanja,

— najmanje dvije vrijednosti tlaka pare i temperature – poželjno je tri ili više – u području između 0 i 50 °C (odnosno od 120 do 150 °C),

— najmanje jedna temperatura treba biti 25 °C ili niža, ako je to tehnički izvedivo kod odabrane metode,

— sve izvorne podatke,

— krivulju log p u ovisnosti o 1/T,

— procjenu tlaka pare na 20 ili 25 °C.

Ako se zapazi prijelaz tvari (u drugo agregatno stanje ili razlaganje), treba navesti sljedeće informacije:

— vrstu promjene,

— temperaturu na kojoj dolazi do promjene pri atmosferskom tlaku,

— tlak pare na 10 i 20 °C ispod temperature prijelaza i 10 i 20 °C iznad te temperature (osim u slučaju prijelaza iz krutog u plinovito stanje).

U izvješću treba navesti sve podatke i primjedbe bitne za tumačenje rezultata, posebno u vezi s nečistoćama i fizikalnim stanjem tvari.

3. **LITERATURA**

1. *Službeni list Europskih zajednica* L 383 A, 26-47 (1992.).

2. Ambrose, D. (1975.). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

3. Weissberger R., ed. (1959.). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946.). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20-048 AFNOR (September 1985.). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

6. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20-047 AFNOR (rujan 1985.). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

8. Knudsen, M. (1909.). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975.). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000.), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

11. Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000.).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964.), 22-28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982.), 269-278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987.), 117-122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973.) 137-147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974.) 393-400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982.) 161-168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995.) 27-31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998.) 300-310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998.) 1512-20.

21. Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st ed. (2000.), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

22. Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002.).

23. 40 CFR, 796. (1993.). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

24. Rordorf B.F. (1985.). Thermochimica Acta 85, 435.

25. Westcott et al. (1981.). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987.). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980.). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28. Fremerey, J.K. (1985.). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Dodatak

Metoda procjene

UVOD

Procijenjene vrijednosti tlaka pare mogu se koristiti:

— za donošenje odluke o tome koja je pokusna metoda najprikladnija,

— za navođenje procijenjene ili granične vrijednosti u slučaju kad se pokusna metoda ne može koristiti iz tehničkih razloga.

METODA PROCJENE

Tlak pare tekućina i krutih tvari može se procijeniti primjenom prilagođene Watsonove korelacije (a). Jedini pokusni podatak koji je potreban je uobičajeno vrelište. Metoda se može primijeniti u području tlaka od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Podrobne informacije o metodi nalaze se u priručniku „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Vidi također OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

RAČUNSKI POSTUPAK

Tlak pare izračunava se na sljedeći način:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

gdje je:

T = tražena temperatura

T_b = uobičajeno vrelište

P_{vp} = tlak pare na temperaturi T

ΔH_{vb} = toplina isparavanja

ΔZ_b = faktor stlačivosti (procijenjen na 0,97)

m = empirijski faktor koji ovisi o fizikalnom stanju na relevantnoj temperaturi

Osim toga:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8{,}75 + R \ln T_b)$$

gdje je K_F empirijski faktor koji uzima u obzir polaritet tvari. Faktori K_F za nekoliko vrsta spojeva navedeni su u literaturi (b).

▼**M1**

Prilično se često može naići na podatke gdje je vrelište navedeno pri sniženom tlaku. U tom se slučaju tlak pare izračunava na sljedeći način:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} ln\,\frac{T}{T_1}\right]$$

gdje je T_1 vrelište pri sniženom tlaku P_1.

IZVJEŠĆE

Kad se koristi metoda procjene, u izvješću treba detaljno dokumentirati čitav računski postupak.

LITERATURA

(a) Watson, K.M. (1943.). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993.).

▼B

A.5. POVRŠINSKA NAPETOST

1. METODA

Opisane metode zasnivaju se na Smjernici za ispitivanje OECD-a (1). Temeljna načela navedena su u referenci (2).

1.1. UVOD

Opisane metode koristit će se za mjerenje površinske napetosti vodenih otopina.

Prije provođenja ovih ispitivanja korisno je raspolagati preliminarnim informacijama o topljivosti tvari u vodi, njezinoj strukturi, hidrolitičkim svojstvima i kritičnim koncentracijama za formiranje micela.

Sljedeće metode primjenljive su na većinu kemijskih tvari, bez ikakvog ograničenja u pogledu stupnja njihove čistoće.

Mjerenje površinske napetosti metodom prstenastog tenzometra ograničeno je na vodene otopine čiji je dinamički viskozitet manji od približno 200 mPa s.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Površinskom napetošću smatra se slobodna površinska entalpija po jedinici površine.

Površinska napetost izražava se kao:

N/m (SI jedinica) ili

mN/m (SI pod-jedinica)

$1\ N/m = 10^3$ din/cm

1 mN/m = 1 din/cm u zastarjelom CGS sustavu

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari nije potrebno upotrebljavati kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

Referentne tvari koje obuhvaćaju široko područje površinskih napetosti navedene su u referencama 1. i 3.

1.4. NAČELO METODA

Metode se temelje na mjerenju maksimalne sile kojom je potrebno vertikalno djelovati na stremen ili na prsten u dodiru s površinom ispitivane tekućine koja se nalazi u mjernoj posudi kako bi ga se odvojilo od te površine, ili na pločicu čiji rub dodiruje površinu, kako bi se nastali film izvukao.

Tvari koje su topljive u vodi kod koncentracija od minimalno 1 mg/l ispituju se u vodenoj otopini kod samo jedne koncentracije.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Ovim se metodama može postići veća preciznost nego što se obično zahtijeva za procjenu utjecaja na okoliš.

▼B

1.6. OPIS METODA

Pripremi se otopina tvari u destiliranoj vodi. Otopina bi trebala biti koncentracije 90 % zasićene otopine tvari u vodi; ako je ta koncentracija veća od 1 g/l, za ispitivanje se upotrebljava koncentracija od 1 g/l. Tvari čija je topljivost u vodi manja od 1 mg/l nije potrebno ispitivati.

1.6.1. **Metoda pločice**

Vidjeti norme ISO 304 i NF T 73-060 (Površinski aktivni agensi – određivanje površinske napetosti izvlačenjem tekućeg filma).

1.6.2. **Metoda stremena**

Vidjeti norme ISO 304 i NF T 73-060 (Površinski aktivni agensi – određivanje površinske napetosti izvlačenjem tekućeg filma).

1.6.3. **Metoda prstena**

Vidjeti norme ISO 304 i NF T 73-060 (Površinski aktivni agensi – određivanje površinske napetosti izvlačenjem tekućeg filma).

1.6.4. **Harmonizirana OECD-ova metoda prstena**

1.6.4.1. *Uređaj*

Za ovo mjerenje prikladni su komercijalno dostupni tenzometri. Tenzometar se sastoji od sljedećih elemenata:

— pokretni stolić za uzorak,

— sustav za mjerenje sile,

— mjerno tijelo (prsten),

— mjerna posuda.

1.6.4.1.1. Pokretni stolić za uzorak

Pokretni stolić za uzorak koristi se kao nosač mjerne posude s regulacijom temperature koja sadrži tekućinu koju treba ispitati. Montiran je na stalak, zajedno sa sustavom za mjerenje sile.

1.6.4.1.2. Sustav za mjerenje sile

Sustav za mjerenje sile (vidjeti sliku) smješten je iznad stolića za uzorak. Pogreška sustava za mjerenje sile ne smije biti veća od $\pm 10^{-6}$ N, što kod mjerenja mase odgovara ograničenju greške od ± 0,1 mg. U većini slučajeva mjerna ljestvica komercijalno dostupnih tenzometara kalibrirana je u mN/m pa je površinsku napetost moguće očitati izravno u mN/m s točnošću od 0,1 mN/m.

▼B

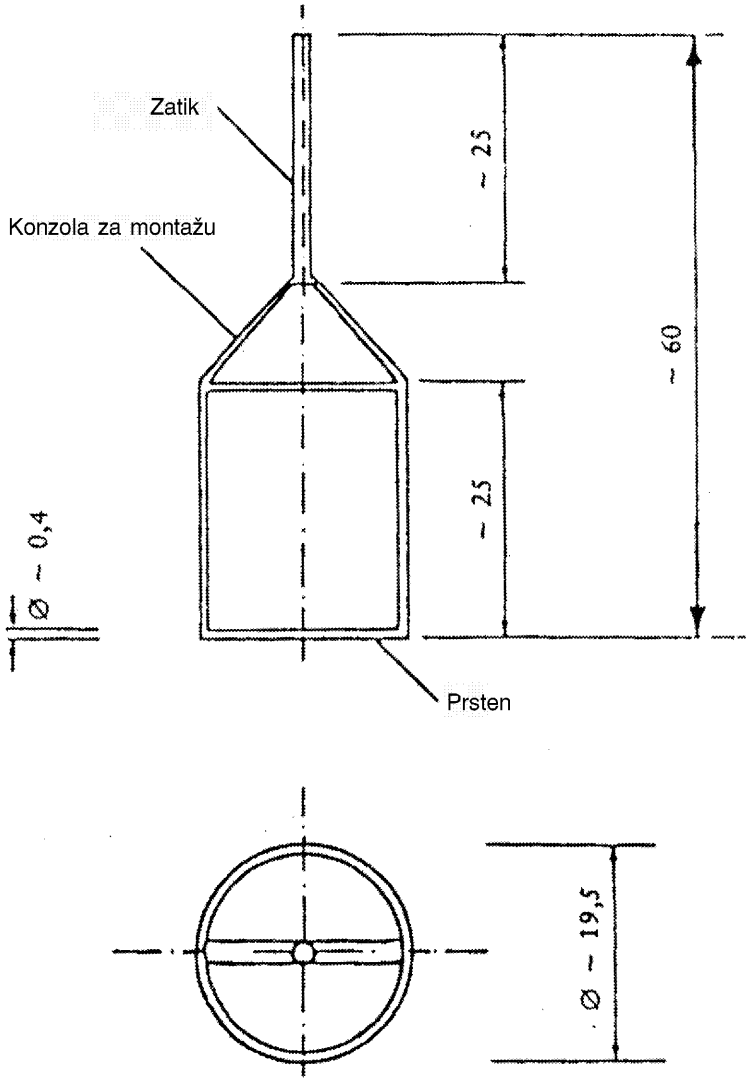
1.6.4.1.3. Mjerno tijelo (prsten)

Prsten je obično izrađen od platina-iridijeve žice debljine oko 0,4 mm i srednjeg opsega 60 mm. Žičani prsten horizontalno je obješen na metalni zatik i konzolu za montažu preko kojih se povezuje sa sustavom za mjerenje sile (vidjeti sliku).

Slika

Mjerno tijelo

(Sve su dimenzije izražene u milimetrima)



1.6.4.1.4. Mjerna posuda

Mjerna posuda s ispitnom otopinom koju treba izmjeriti staklena je posuda s regulacijom temperature. Mora biti konstruirana na način da tijekom mjerenja temperatura ispitne otopine i plinske faze iznad njezine površine ostane stalna i da uzorak ne može isparavati. Prihvatljive su cilindrične staklene posude unutarnjeg promjera najmanje 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Priprema uređaja*

1.6.4.2.1. Čišćenje

Staklene posude treba pažljivo očistiti. Po potrebi treba ih oprati vrućom krom-sumpornom kiselinom i zatim gustom tekućom fosfornom kiselinom (od 83 do 98 % težinskog udjela H_3PO_4), u potpunosti isprati tekućom vodom i na kraju prati dvostruko destiliranom vodom sve dok se ne postigne neutralna reakcija, te zatim osušiti i isprati s dijelom tekućeg uzorka koji će se mjeriti.

Prsten prvo treba potpuno namočiti u vodu kako bi se s njega uklonile sve tvari topljive u vodi, nakratko uroniti u krom-sumpornu kiselinu, prati dvostruko destiliranom vodom sve dok se ne postigne neutralna reakcija, i na kraju kratkotrajno zagrijati iznad plamena metanola.

Napomena:

Kontaminacija tvarima koje se ne tope u krom-sumpornoj ili fosfornoj kiselini niti ih ona uništava, npr silikonima, otklanja se pomoću odgovarajućeg organskog otapala.

1.6.4.2.2. Kalibracija uređaja

Validacija uređaja sastoji se od verifikacije nulte točke i njezinog podešavanja na način da indikacija na instrumentu omogućuje pouzdano određivanje vrijednosti u mN/m.

Montaža:

Uređaj mora biti postavljen na postolje tenzometra u ravnini, primjerice pomoću libele i podešavanjem nivelacijskih vijaka na postolju.

Podešavanje nulte točke:

Nakon montaže prstena na uređaj, a prije uranjanja u tekućinu, treba provjeriti da je indikacija tenzometra podešena na nulu, a prsten postavljen paralelno s površinom tekućine. U tu svrhu, površina tekućine može se upotrijebiti kao zrcalo.

Kalibracija:

Kalibracija za određeni pokus može se izvršiti bilo kojim od sljedeća dva postupka:

(a) Korištenjem mase: postupak pomoću jahača poznate mase između 0,1 i 1,0 g koji se postavljaju na prsten. Faktor kalibracije, Φ_a, kojim se množe sve očitanja na instrumentu određuje se prema jednadžbi (1).

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

gdje je:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa jahača (g)

g = ubrzanje sile teže (981 cm s^{-2} na morskoj razini)

b = srednji opseg prstena (cm)

σ_a = očitanje tenzometra nakon stavljanja jahača na prsten (mN/m)

▼B

(b) Korištenjem vode: postupak pomoću čiste vode čija je površinska napetost, primjerice, na 23 °C jednaka 72,3 mN/m. Taj se postupak može provesti brže nego kalibracija utegom, ali uvijek postoji opasnost da površinska napetost vode bude lažno predstavljena zbog tragova kontaminacije surfaktantima.

Faktor kalibracije, Φ_a, kojim se množe sve očitanja na instrumentu, određuje se prema jednadžbi (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

gdje je:

σo = vrijednost koja se za površinsku napetost vode navodi u literaturi (mN/m)

σ_g = izmjerena vrijednost površinske napetosti vode (mN/m), obje kod iste temperature

1.6.4.3. *Priprema uzoraka*

Vodene otopine pripremaju se od tvari koje će se ispitivati, u potrebnim koncentracijama u vodi, i ne smiju sadržavati neotopljene tvari.

Otopina se mora održavati na stalnoj temperaturi (± 0,5 °C). Kako se površinska napetost otopine u mjernoj posudi tijekom vremena mijenja, treba provesti nekoliko mjerenja u raznim vremenima, a krivulju koja pokazuje površinsku napetost iscrtati kao funkciju vremena. Kad više nema promjena, postignuto je stanje ravnoteže.

Kontaminacija prašinom i plinovima drugih tvari ometa mjerenje. Posao stoga treba obaviti ispod zaštitnog pokrivača.

1.6.5. **Ispitni uvjeti**

Mjerenje se provodi na približno 20 °C i kontrolira se unutar ± 0,5 °C.

1.6.6. **Provođenje ispitivanja**

Otopine na kojima se obavljaju mjerenja prenose se u pažljivo očišćenu mjernu posudu, vodeći računa da se ne zapjene, pa se zatim mjerna posuda stavlja na stolić ispitnog uređaja. Gornji dio stola s mjernom posudom podiže se sve dok se prsten ne uroni ispod površine otopine koja se mjeri. Nakon toga, sve dok se ne postigne maksimalna sila, gornji dio stola se postupno i jednolično spušta (brzinom od oko 0,5 cm/min) kako bi se prsten odvojio od površine. Sloj tekućine koji se drži za prsten ne smije se odvojiti od njega. Kad su mjerenja završena, prsten se ponovno uranja ispod površine i mjerenje se ponavlja sve dok se ne postigne stalna napetost površine. Vrijeme od prenošenja otopine u mjernu posudu bilježi se za svako određivanje. Vrijednosti se očitavaju kod maksimalne sile koja je potrebna da se prsten odvoji od površine tekućine.

▼B

2. **PODACI**

Za izračun površinske napetosti, vrijednost očitanja u mN/m na uređaju prvo se množi s faktorom kalibracije Φ_a ili Φ_b (u zavisnosti o tome koji je postupak kalibracije primijenjen). Time se dolazi samo do približne vrijednosti koju stoga treba ispraviti.

Harkins i Jordan (4) empirijski su odredili korektivne faktore za vrijednosti površinske napetosti izmjerene metodom prstena koji ovise o promjerima prstena, gustoći tekućine i njezinoj površinskoj napetosti.

Kako je utvrđivanje korektivnog faktora za svako pojedino mjerenje iz Harkinsovih i Jordanovih tablica mukotrpan posao, za izračun površinske napetosti vodenih otopina može se primijeniti pojednostavnjeni postupak očitavanja ispravljenih vrijednosti površinske napetosti izravno iz tablice. (Za očitanja u područjima između vrijednosti navedenih u tablici primjenjuje se interpolacija.)

Tablica:

Korekcija izmjerene površinske napetosti

Samo za vodene otopine, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (promjer prosječnog prstena)
r	= 0,185 mm (promjer žice od koje je prsten izrađen)

Eksperimentalna vrijednost (mN/m)	Korigirana vrijednost (mN/m)	
	Kalibracija utegom (vidjeti 1.6.4.2.2.(a))	Kalibracija vodom (vidjeti 1.6.4.2.2.(b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Eksperimentalna vrijednost (mN/m)	Korigirana vrijednost (mN/m)	
	Kalibracija utegom (vidjeti 1.6.4.2.2.(a))	Kalibracija vodom (vidjeti 1.6.4.2.2.(b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Podaci u ovoj tablici prikupljeni su na temelju Harkins-Jordanove korekcije. Slična je tablici u normi DIN (DIN 53914) za vodu i vodene otopine (gustoća ρ = 1 g/cm^3 i za komercijalno dostupan prsten dimenzije R = 9,55 mm (srednji promjer prstena) i r = 0,185 mm (promjer žice od koje je izrađen prsten). U tablici su navedene korigirane vrijednosti za vrijednosti mjerenja površinske napetosti nakon kalibracije s utezima ili kalibracije vodom.

Alternativno, bez prethodne kalibracije, površinska napetost može se izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

gdje je:

F = sila izmjerena na dinamometru u točki pucanja filma

R = promjer prstena

f = korektivni faktor (1)

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1 IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— primijenjena metoda,

— tip vode ili otopine koja je upotrijebljena.

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— rezultati mjerenja: (očitanje) površinske napetosti s tim da se navedu i pojedinačna očitanja i njihove aritmetičke sredine kao i korigirana srednja vrijednost (uzimajući u obzir faktor opreme i tablicu s korekcijama),

▼B

— koncentracija otopine,

— ispitna temperatura,

— starost otopine koja je upotrijebljena; posebno vrijeme između pripreme i mjerenja otopine,

— opis kako površinska napetost zavisi o vremenu nakon prijenosa otopine u mjernu posudu,

— sve informacije i opaske relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje tvari.

3.2. TUMAČENJE REZULTATA

Uzimajući u obzir da destilirana voda ima površinsku napetost od 72,75 mN/m na 20 °C, tvari kod kojih je u uvjetima ove metode uočena površinska napetost niža od 60 mN/m treba smatrati površinski aktivnim materijalima.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Testing Guideline 1152, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, str. 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, str. 1751.

▼M4

A.6. **TOPLJIVOST U VODI**

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 105 (1995.). Ova je ispitna metoda revidirana verzija originalne smjernice TG 105 donesene 1981. Nema razlike u sadržaju između aktualne verzije i verzije iz 1981. Promijenjen je uglavnom format. Revizija se temelji na ispitnoj metodi EU-a „Topljivost u vodi” ([1]).

UVODNA RAZMATRANJA

2. Prisutnost nečistoća može znatno utjecati na topljivost tvari u vodi. Ova se ispitna metoda bavi određivanjem topljivosti u vodi tvari koje su načelno čiste, stabilne u vodi i nehlapljive. Prije određivanja topljivosti u vodi korisno je imati neke preliminarne podatke o ispitivanoj tvari, kao što su strukturna formula, tlak pare, konstanta disocijacije i hidroliza kao funkcija pH.

3. U ovoj ispitnoj metodi opisane su dvije metode, metoda eluiranja kolone i metoda tikvice, koje obuhvaćaju odgovarajuću topljivost ispod i iznad 10^{-2} g/l. Također je opisan i jednostavni preliminarni test. Taj test omogućuje određivanje približno prikladnog broja uzoraka koji će se rabiti u završnom ispitivanju te vrijeme potrebno za postizanje zasićenja.

DEFINICIJE I JEDINICE

4. Topljivost tvari u vodi jest koncentracija mase zasićenosti tvari u vodi na zadanoj temperaturi.

5. Topljivost u vodi izražava se masom otopljene tvari po volumenu otopine. Jedinica prema sustavu SI je kg/m^3, ali se može rabiti i g/l.

REFERENTNE KEMIKALIJE

6. Pri istraživanju ispitivane tvari ne moraju se primjenjivati referentne kemikalije.

OPIS METODA

Uvjeti ispitivanja

7. Ispitivanje valja provoditi na 20 ± 0,5 °C. Odabranu temperaturu valja održavati konstantnom u svim relevantnim dijelovima opreme.

Preliminarno ispitivanje

8. Sve veći volumeni vode na sobnoj temperaturi postupno se dodaju u otprilike 0,1 g uzorka (krute ispitivane tvari moraju se fino usitniti) u cilindar od 10 ml sa staklenim čepom. Nakon svakog dodavanja određene količine vode mješavinu treba protresati 10 minuta i zatim vizualno provjeriti ima li u uzorku još neotopljenih dijelova. Ako nakon dodavanja 10 ml vode uzorak ili dijelovi uzorka ostanu neotopljeni, pokus treba ponoviti u cilindru od 100 ml. Približna topljivost navedena je u tablici 1. pod onim volumenom vode u kojem dolazi do potpunog otapanja uzorka. Ako je topljivost niska,

▼M4

može biti potrebno dugo vrijeme za otapanje ispitivane tvari za što treba omogućiti najmanje 24 sata. Ako se nakon 24 sata ispitivana tvar još uvijek ne otopi, treba produljiti vrijeme otapanja (do 96 sati) ili je pokušati dodatno razrijediti kako bi se utvrdilo treba li primijeniti metodu eluiranja kolone ili metodu tikvice.

Tablica 1.

ml vode na 0,1 g otopljene tvari	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
približna topljivost u g/l	> 1 000	1 000 do 200	200 do 100	100 do 50	50 do 10	10 do 1	< 1

Metoda eluiranja kolone

Načelo

9. Ova se metoda zasniva na eluiranju vodom ispitivane tvari iz mikro-kolone koja je napunjena inertnim nosivim materijalom, prethodno obloženim prekomjernom količinom ispitivane tvari (2). Topljivost u vodi određuje se kada koncentracija mase eluata dosegne plato kao funkciju vremena.

Aparatura

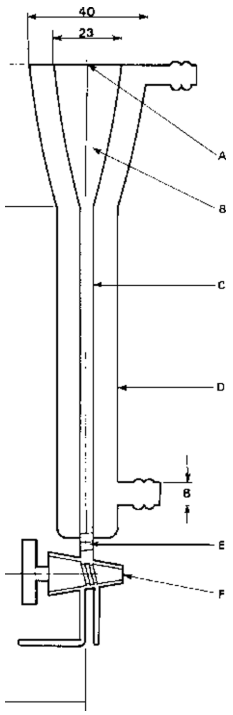
10. Aparatura obuhvaća mikro-kolonu (slika 1.) koja se održava na konstantnoj temperaturi. Mikro-kolona je povezana s recirkulacijskom crpkom (slika 2.) ili nivelacijskom posudom (slika 3.). Mikro-kolona sadrži inertni nosač koji na mjestu drži mali čep od staklene vune koji također služi i za filtriranje čestica. Materijali koji se mogu upotrijebiti kao nosač jesu staklene kuglice, dijatomejska zemlja ili drugi inertni materijali.

11. Mikro-kolona prikazana na slici 1. prikladna je za povezivanje s recirkulacijskom crpkom. U koloni iznad uzorka mora biti mjesta za pet volumena vode (koji se odbacuju na početku pokusa) i volumen pet uzoraka (koji se uzimaju za analizu tijekom pokusa). Druga je mogućnost smanjiti veličinu ako se sustavu tijekom pokusa može dodavati voda kako bi se zamijenilo početnih pet volumena vode koji su uklonjeni s nečistoćama. Kolona je preko cijevi od inertnog materijala povezana s recirkulacijskom crpkom koja može dobaviti približno 25 ml/h. Recirkulacijska crpka može biti, primjerice, peristaltička ili membranska crpka. Treba voditi računa da ne dođe do kontaminacije materijalom same cijevi i/ili adsorpcije na materijal cijevi.

12. Shematski raspored s nivelacijskom posudom prikazan je na slici 3. U tom je rasporedu mikro-kolona opremljena jednosmjernom slavinom. Spoj s nivelacijskom posudom sastoji se od ubrušenog staklenog spoja i cjevovoda od inertnog materijala. Brzina protoka iz nivelacijske posude trebala bi iznositi otprilike 25 ml/h.

▼**M4**

Slika 1.



Dimenzije u mm

A. Priključak za ubrušeni stakleni spoj

B. Prostor u koloni

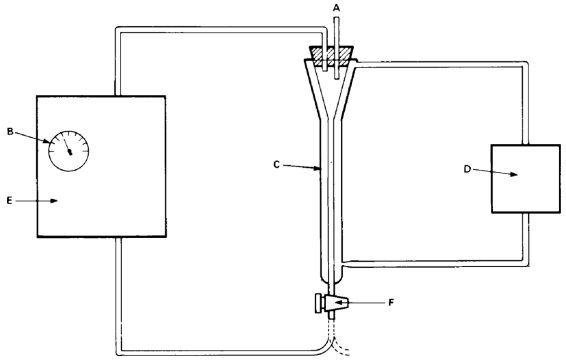
C. Unutrašnji 5

D. Vanjski 19

E. Čep od staklene vune

F. Slavina

Slika 2.



A. Atmosfersko uravnoteženje

B. Mjerač protoka

C. Mikro-kolona

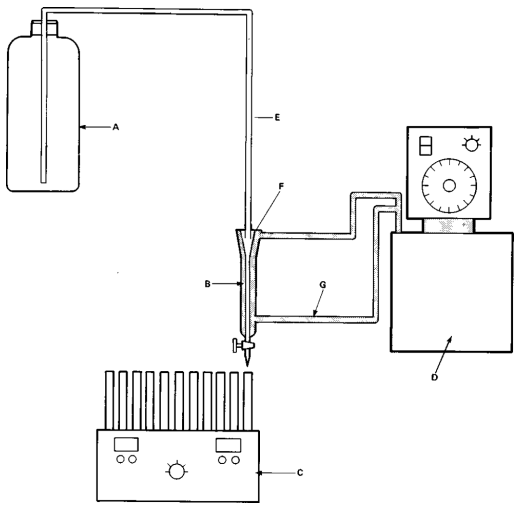
D. Termostatski kontrolirana crpka za cirkulaciju

E. Recirkulacijska crpka

F. Dvosmjerni ventil za uzorkovanje

▼M4

Slika 3.



A. Nivelacijska posuda (npr. 2,5-litarska tikvica)

B. Kolona

C. Skupljač frakcije

D. Termostat

E. Teflonski cjevovod

F. Ubrušeni stakleni spoj

G. Cjevovod (između termostata i kolone, unutarnjeg promjera približno 8 mm)

13. Oko 600 mg nosivog materijala prebacuje se u tikvicu zaobljenog dna od 50 ml. Odgovarajuća količina ispitivane tvari otapa se u hlapljivom otapalu kvalitete analitičkog reagensa, a odgovarajuća količina te otopine dodaje se nosivom materijalu. Otapalo posve isparava, npr. primjenom okretnog isparivača, jer se u protivnom neće postići zasićenost nosača vodom tijekom faze eluacije zbog razdjeljivanja na površini. Napunjeni nosivi materijal namače se dva sata u oko 5 ml vode, a zatim se ta otopina ulijeva u mikro-kolonu. Kao druga mogućnost, suhi napunjeni nosivi materijal može se usuti u mikro-kolonu ispunjenu vodom i ostaviti dva sata da se uravnoteži.

14. Dodavanje nosivog materijala može izazvati probleme koji dovode do pogrešnih rezultata, npr. kad se ispitivana tvar taloži kao ulje. Takve probleme valja ispitati i izvijestiti o pojedinostima.

Postupak s recirkulacijskom crpkom

15. Započinje protok kroz kolonu. Preporuča se primjena brzine protoka od približno 25 ml/h, što kod opisane kolone odgovara veličini od 10 volumena punjenja na sat. Najmanje prvih pet volumena vode potroše se na uklanjanje nečistoća topljivih u vodi. Nakon toga, crpka se ostavi u radu dok se ne postigne ravnoteža, nasumice utvrđena s pet uzastopnih uzoraka čije se koncentracije ne razlikuju za više od ± 30 %. Te uzorke treba međusobno razdvojiti vremenskim intervalima koji odgovaraju prolasku najmanje deset volumena punjenja. Ovisno o primijenjenoj analitičkoj metodi, prednost se može dati izradi krivulje koncentracije u ovisnosti o vremenu kako bi se pokazalo da je postignuta ravnoteža.

▼M4

Postupak s nivelacijskom posudom

16. Susljedne frakcije eluata treba prikupiti i analizirati odabranom metodom. Za određivanje topljivosti koriste se frakcije iz srednjeg područja eluata u kojem su koncentracije stalne unutar ± 30 % u najmanje pet uzastopnih frakcija.

17. Najprikladniji je eluat dvostruko destilirana voda. Također se može upotrebljavati i deionizirana voda s otpornošću većom od 10 megaohm/cm i ukupnim sadržajem organskog ugljika ispod 0,01 %.

18. U oba slučaja drugi krug pokusa treba provesti s pola brzine protoka prvog kruga. Ako se rezultati oba kruga slažu, ispitivanje se smatra zadovoljavajućim. Ako je izmjerena topljivost veća s nižom brzinom protoka, tada se prepolavljanje brzine protoka mora nastaviti sve dok dva uzastopna kruga ne daju istu topljivost.

19. U oba slučaja kod frakcija treba provjeriti prisutnost koloidne tvari na način da se provjeri javlja li se Tyndallov efekt. Prisutnost takvih čestica ispitivanje čini nevaljanim te ispitivanje valja ponoviti nakon poboljšanja filtriranja kolone.

20. Valja izmjeriti pH vrijednost svakog uzorka, po mogućnosti posebnim indikatorskim trakama.

Metoda tikvice

Načelo

21. Ispitivana tvar (krutine treba fino usitniti) otapa se u vodi na temperaturi malo višoj od ispitne temperature. Kada se postigne zasićenje, smjesa se hladi i održava na ispitnoj temperaturi. Ako je odgovarajućim uzorkovanjem potvrđeno da se postiglo uravnoteženje zasićenosti, mjerenje se alternativno može obaviti izravno na ispitnoj temperaturi. Zatim se koncentracija mase ispitivane tvari u vodenoj otopini, koja ne smije sadržavati neotopljene čestice, određuje prikladnom analitičkom metodom (3).

Aparatura

22. Potreban je sljedeći materijal:

— obične laboratorijske staklene posude i instrumenti,

— uređaj za miješanje otopina na kontroliranoj konstantnoj temperaturi,

— centrifuga (poželjno termostatski regulirana), po potrebi s emulzijama, i

— analitička oprema.

Postupak

23. Količina ispitivane tvari koja je potrebna za zasićenje željenog volumena vode procjenjuje se iz preliminarnog ispitivanja. U svaku od tri staklene posude opremljene staklenim zatvaračima (npr. cijevi centrifuge, tikvice) odmjerava se peterostruka gore određena količina tvari. U svaku posudu dodaje se volumen vode odabran ovisno o analitičkoj metodi i području topljivosti. Posude se čvrsto začepe i protresaju na 30 °C. Treba koristiti uređaj za protresanje ili miješanje koji može raditi na stalnoj temperaturi, npr. magnetsku miješalicu u termostatiranoj vodenoj kupki. Nakon jednog dana jedna od posuda uravnotežuje se 24 sata na temperaturi ispitivanja uz povremeno protresanje. Sadržaj posude zatim se centrifugira na temperaturi

▼M4

ispitivanja, a koncentracija ispitivane tvari u jasnoj vodenoj fazi određuje se odgovarajućom analitičkom metodom. S druge dvije tikvice postupa se na sličan način nakon početnog uravnoteženja na 30 °C tijekom dva odnosno tri dana. Ako se koncentracije izmjerene u najmanje dvije posljednje posude ne razlikuje za više od 15 %, ispitivanje se smatra uspješnim. Ako rezultati iz posuda 1., 2. i 3. imaju tendenciju sve većih vrijednosti, ispitivanje treba u potpunosti ponoviti s duljim vremenom uravnoteženja.

24. Ispitivanje se također može provoditi i bez prethodne inkubacije na 30 °C. Kako bi se procijenila brzina postizanja uravnoteženja zasićenja, uzorci se uzimaju sve do trenutka kada vrijeme miješanja više nema utjecaja na izmjerene koncentracije.

25. Valja izmjeriti pH vrijednost svakog uzorka, po mogućnosti posebnim indikatorskim trakama.

Analitička određivanja

26. Za ova ispitivanja poželjno je analitičku metodu odrediti točno prema ispitivanoj tvari jer male količine topljivih nečistoća mogu uzrokovati velike pogreške u izmjerenoj topljivosti. Te metode mogu biti primjerice plinska ili tekućinska kromatografija, titracija, fotometrija te voltametrija.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

Metoda eluiranja kolone

27. Za svaki krug treba izračunati srednju vrijednost i standardnu devijaciju najmanje pet uzastopnih uzoraka izmjerenih kod platoa zasićenja. Srednje vrijednosti dobivene iz prvih dvaju ispitivanja s različitim protocima ne smiju se razlikovati za više od 30 %.

Metoda tikvice

28. Za svaku od tri tikvice treba izračunati prosjek pojedinačnih rezultata koji se ne bi smjeli razlikovati za više od 15 %.

Izvješće o ispitivanju

Metoda eluiranja kolone

29. U izvješću o ispitivanju moraju se navesti sljedeće informacije:

— rezultati preliminarnog testa,

— kemijski identitet i nečistoće (preliminarni korak pročišćavanja ako postoji),

— koncentracije, brzine protoka i pH vrijednost svakog uzorka,

— srednje vrijednosti i standardna odstupanja od najmanje pet uzoraka na platou zasićenja svakog kruga,

— prosječna vrijednost najmanje dva uzastopna kruga,

— temperatura vode tijekom postupka zasićenja,

— metoda analize,

— narav nosivog materijala,

— punjenje nosivog materijala,

— primijenjeno otapalo,

— dokaz o eventualnoj kemijskoj nestabilnosti tvari tijekom ispitivanja,

— sve podatke i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje ispitivane tvari.

▼**M4**

Metoda tikvice

30. U izvješću o ispitivanju moraju se navesti sljedeće informacije:

— rezultati preliminarnog testa,

— kemijski identitet i nečistoće (preliminarni korak pročišćavanja ako postoji),

— pojedinačna analitička određivanja i prosjek ako je za svaku tikvicu određeno više od jedne vrijednosti,

— pH vrijednost svakog uzorka,

— prosječne vrijednosti za različite tikvice koje su međusobno usklađene,

— temperatura ispitivanja,

— analitička metoda,

— dokaz o eventualnoj kemijskoj nestabilnosti tvari tijekom ispitivanja,

— sve podatke i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje ispitivane tvari.

LITERATURA

1. Direktiva Komisije 92/69/EEZ od 31. srpnja 1992. o sedamnaestoj prilagodbi tehničkom napretku Direktive Vijeća 67/548/EEZ o usklađivanju zakona i ostalih propisa o razvrstavanju, pakiranju i označivanju opasnih tvari, SL L 383, 29.12.1992., str. 54.

2. NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3. NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8. KOEFICIJENT RAZDJELJENJA

1. METODA

Opisana metoda „protresanjem u tikvici” temelji se na Smjernici za ispitivanje OECD-a (1).

1.1. UVOD

Prije provođenja ovog ispitivanja korisno je za tvar koja se ispituje posjedovati preliminarne informacije o strukturnoj formuli, konstanti disasocijacije, topljivosti u vodi, hidrolizi, topljivosti u n-oktanolu i površinskoj napetosti.

Mjerenja treba provoditi na ionizirajućim tvarima samo kad su u neioniziranom obliku (slobodne kiseline ili slobodne lužine) dobivene primjenom odgovarajuće pufer otopine pH vrijednosti najmanje jednu pH jedinicu ispod (za slobodne kiseline) ili iznad (za slobodne lužine) vrijednosti pK.

Ovom ispitnom metodom obuhvaćena su dva odvojena postupka: metoda protresanjem u tikvici i visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC). Prvi je primjenljiv kad log P_{ow} (vidjeti definiciju dalje u tekstu) pripada području – 2 do 4, a drugi u području 0 do 6. Prije izvršenja bilo kojega od tih eksperimentalnih postupaka prvo treba dobiti preliminarnu procjenu koeficijenta razdjeljenja.

Metoda protresanjem u tikvici primjenljiva je samo na bitno čiste tvari topljive u vodi i n-oktanolu. Nije primjenljiva na površinski aktivne materijale (za koje treba osigurati izračunanu ili procijenjenu vrijednost na temelju pojedinačnih vrijednosti topljivosti u n-oktanolu i vodi).

Metoda visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC) nije primjenljiva na jake kiseline ili lužine, metalne komplekse, površinski aktivne materijale ili tvari koje reagiraju s eluensom. Za te materijale treba osigurati izračunanu ili procijenjenu vrijednost na temelju pojedinačnih vrijednosti topljivosti u n-oktanolu i vodi.

Metoda HPLC manje je osjetljiva na prisutnost nečistoća u ispitivanim spojevima nego metoda protresanjem u tikvici. Bez obzira na to u nekim slučajevima nečistoće mogu otežati tumačenje rezultata jer vršne vrijednosti nije moguće odrediti sa sigurnošću. Za mješavine koje daju nerazlučeni pojas, treba navesti gornju i donju granicu vrijednosti log P.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Koeficijent razdjeljenja (P) definira se kao omjer uravnoteženih koncentracija (c_i) otopljene tvari u dvofaznom sustavu koji obuhvaća dva otapala koja uglavnom nije moguće miješati. Kad se radi o n-oktanolu i vodi:

$$p_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Dakle, koeficijent razdjeljenja (P) količnik je dviju koncentracija, a obično se izražava u obliku svojega logaritma na bazu 10 (log P).

▼B

1.3. REFERENTNE TVARI

Metoda protresanjem u tikvici

Referentne tvari nije potrebno upotrebljavati kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

Metoda HPLC

Radi postavljanja korelacije između podataka koji su metodom HPLC izmjereni o nekom spoju s njegovom vrijednošću koeficijenta razdjeljenja P, treba uspostaviti kalibracijsku krivulju log P u odnosu na podatke dobivene kromatografijom pomoću najmanje šest referentnih točaka. Odgovarajuće referentne tvari odabire sam korisnik. Kad god je to moguće, najmanje jedan referentni spoj treba imati P_{ow} iznad P_{ow} vrijednosti ispitivane tvari, a P_{ow} vrijednost drugog spoja treba biti ispod P_{ow} vrijednosti ispitivane tvari. Za vrijednosti log P ispod 4, kalibracija se može temeljiti na podacima dobivenim metodom protresanjem u tikvici. Za vrijednosti log P veće od 4, kalibracija se može temeljiti na validiranim vrijednostima iz literature ako se te vrijednosti podudaraju s izračunanim vrijednostima. Radi veće točnosti, poželjno je odabrati referentne spojeve koji su strukturno srodni ispitivanoj tvari.

Dostupan je dugi popis vrijednosti log P_{ow} za mnogo skupina kemikalija (2)(3). Ako podaci o koeficijentima razdjeljenja strukturno srodnih spojeva nisu dostupni, može se primijeniti općenitija kalibracija, utvrđena s drugim referentnim spojevima.

Popis preporučenih referentnih tvari i njihovih vrijednosti P_{ow} naveden je u Dodatku 2.

1.4. NAČELO METODE

1.4.1. **Metoda protresanjem u tikvici**

Kako bi se odredio koeficijent razdjeljenja, između svih sastavnih dijelova sustava treba postići ravnotežu i odrediti koncentracije tvari otopljenih u dvije faze. Proučavanje te teme u literaturi pokazuje da za rješenje tog problema postoji nekoliko raznih tehnika, tj. potpunog miješanja dvije faze nakon kojega slijedi njihovo odvajanje kako bi se odredila koncentracija ravnoteže za tvari koje se ispituju.

1.4.2. **Metoda HPLC**

HPLC se provodi na analitičkim kolonama punjenim komercijalno dostupnom krutom fazom koja sadrži duge lance ugljikovodika (npr.C_8, C_{18}) kemijski vezane na silicijev dioksid. Kemikalije koje se ubrizgavaju u takvu kolonu kreću se duž nje različitim brzinama zbog različitih stupnjeva razdjeljenja između mobilne faze i stacionarne faze ugljikovodika. Mješavine kemikalija eluiraju redom svoje hidrofobičnosti, s tim da kemikalije topljive u vodi eluiraju prve, a kemikalije topljive u ulju posljednje, proporcionalno svojem koeficijentu razdjeljenja ugljikovodik/voda. To omogućuje uspostavljanje veze između vremena zadržavanja na toj koloni (obrnuta faza) i koeficijenta razdjeljenja n-oktanol/voda. Koeficijent razdjeljenja dobiva se iz *faktora kapaciteta* k izraženog kao:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

gdje je t_r = vrijeme zadržavanja ispitivane tvari, a t_o = prosječno vrijeme koje molekuli otapala treba za prolaz kroz kolonu (mrtvo vrijeme).

Kvantitativne analitičke metode nisu potrebne, već treba samo odrediti vremena eluiranja.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

1.5.1. **Ponovljivost**

Metoda protresanjem u tikvici

Kako bi se osigurala točnost koeficijenta razdjeljenja, u tri različita ispitna uvjeta treba provesti dvostruko određivanje, pri čemu količina konkretne tvari kao i omjer volumena otapala mogu biti različiti. Određene vrijednosti koeficijenta razdjeljenja izražene kao njihovi zajednički logaritmi trebaju se kretati u području ± 0,3 log jedinica.

Metoda HPLC

Kako bi se povećala pouzdanost mjerenja, treba provoditi dvostruka određivanja. Vrijednosti log P derivirane iz pojedinačnih mjerenja trebaju se kretati u području ± 0,1 log jedinica.

1.5.2. **Osjetljivost**

Metoda protresanjem u tikvici

Mjerno područje ove metode određeno je granicom detekcije analitičkog postupka. Taj bi postupak trebao omogućiti procjenu vrijednosti log P_{ow} u području od – 2 do 4 (povremeno, kad to uvjeti dopuštaju, to se područje može proširiti na vrijednosti log P_{ow} do 5) kad koncentracija topljive tvari u jednoj ili drugoj fazi nije veća od 0,01 mol po litri.

Metoda HPLC

Metoda HPLC omogućuje procjenu koeficijenata razdjeljenja vrijednosti log P_{ow} u području od 0 do 6.

Koeficijent razdjeljenja spoja obično se može procijeniti unutar ± 1 log jedinice vrijednosti dobivene metodom protresanjem u tikvici. Tipična korelacija može se naći u literaturi (4)(5)(6)(7)(8). Velika točnost obično se može postići kad se korelacijske krivulje temelje na strukturno srodnim referentnim spojevima (9).

▼B

1.5.3. **Specifičnost**

Metoda protresanjem u tikvici

Nernstov zakon razdjeljenja važi samo kod stalne temperature, tlaka i pH vrijednosti za razrijeđene otopine. Strogo važi za čistu tvar raspršenu između dva čista otapala. Ako se nekoliko različitih topljivih tvari istodobno nađe u jednoj ili obje faze, to može imati utjecaja na rezultate.

Disocijacija ili asocijacija otopljenih molekula vode do odstupanja od Nernstovog zakona razdjeljenja. Na ta odstupanja ukazuje činjenica da koeficijent razdjeljenja postaje ovisan o koncentraciji otopine.

S obzirom da se radi o višestrukim ravnotežama, ovu ispitnu metodu na ionizirajuće spojeve trebalo bi primjenjivati samo uz primjenu korekcije. Za takve spojeve treba razmotriti upotrebu pufer otopina umjesto vode; s tim da se pH vrijednost pufer otopine treba za najmanje 1 pH jedinicu razlikovati od vrijednosti pKa tvari, vodeći računa o relevantnosti te pH vrijednosti za okoliš.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Preliminarna procjena koeficijenta razdjeljenja**

Koeficijent razdjeljenja poželjno je procijeniti metodom izračuna (vidjeti Dodatak 1.), ili kad je to primjereno, iz omjera topljivosti ispitivane tvari u čistim otapalima (10).

1.6.2. **Metoda protresanjem u tikvici**

1.6.2.1. *Priprema*

n-oktanol: određivanje koeficijenta razdjeljenja treba provesti pomoću reagensa analitičke kvalitete visoke čistoće.

Voda: treba upotrebljavati vodu destiliranu ili dvostruko destiliranu u uređaju sa staklom ili kvarcnim pijeskom. Za ionizirajuće spojeve, kad je to opravdano, treba koristiti pufer otopinu umjesto vode.

Napomena:

Ne bi trebalo koristiti vodu uzetu izravno iz ionskog izmjenjivača.

1.6.2.1.1. Prethodno zasićenje otapala

Prije određivanja koeficijenta razdjeljenja, faze sustava otapala obostrano se zasićuju protresanjem na temperaturi pokusa. Za to je praktično tresti dvije velike stock boce n-oktanola analitičke kvalitete visoke čistoće ili vode, i jednog i drugog s dovoljnim količinama drugog otapala, tijekom 24 sata na mehaničkoj miješalici pa ih zatim ostaviti da stoje dovoljno dugo kako bi se faze odvojile i postiglo stanje zasićenja.

▼B

1.6.2.1.2. Priprema ispitivanja

Čitav volumen dvofaznog sustava treba gotovo ispuniti ispitnu posudu. Time će se spriječiti gubitak materijala uslijed hlapljenja. Omjer volumena i količine tvari koje treba upotrijebiti utvrđuju se na sljedeći način:

— prethodnom procjenom koeficijenta razdjeljenja (vidjeti gore),

— minimalnom količinom ispitivane tvari koja je potrebna za analitički postupak, i

— ograničenjem maksimalne koncentracije u svakoj od faza na 0,01 mol po litri.

Provode se tri ispitivanja. U prvom se primjenjuje izračunani omjer volumena n-oktanola i vode; u drugom se taj omjer dijeli s dva; i u trećem, taj se omjer množi s dva (npr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Ispitivana tvar

Matična otopina pripravlja se u n-oktanolu prethodno zasićenom vodom. Koncentraciju matične otopine treba točno utvrditi prije određivanja koeficijenta razdjeljenja. Tu otopinu treba skladištiti u uvjetima koji će osigurati njezinu stabilnost.

1.6.2.2. *Ispitni uvjeti*

Temperaturu ispitivanja treba držati stalnom (± 1 °C) i u području od 20 do 25 °C.

1.6.2.3. *Postupak mjerenja*

1.6.2.3.1. Uspostavljanje ravnoteže razdjeljenja

Za svaki od uvjeta ispitivanja treba pripraviti dvostruke ispitne posude koje sadrže potrebnu točno odmjerenu količinu dva otapala zajedno s potrebnom količinom matične otopine. N-oktanol faze treba odmjeriti volumenski. Ispitne posude treba postaviti u odgovarajući uređaj za protresanje ili tresti rukom. Ako se koristi centrifugalna cijev, preporuča se metoda brze vrtnje cijevi kroz 180° oko njezine transverzalne osi kako bi se eventualno zaostali zrak mogao izdići kroz faze. Iskustvo je pokazalo da je 50 takvih rotacija obično dostatno za uspostavljanje ravnoteže razdjeljenja. Radi sigurnosti, preporuča se 100 rotacija u pet minuta.

1.6.2.3.2. Faza separacije

Ako je potrebno, za odvajanje faza potrebno je provesti centrifugiranje mješavine. To se radi u laboratorijskoj centrifugi koja se drži na sobnoj temperaturi ili, ako se rabi centrifuga bez regulacije temperature, radi uravnoteženja, centrifugalne cijevi treba držati na temperaturi ispitivanja najmanje jedan sat prije analize.

▼B

1.6.2.4. *Analiza*

Za određivanje koeficijenta razdjeljenja, potrebno je odrediti koncentracije ispitivanih tvari u obje faze. To se može učiniti na način da se uzme alikvot od svake od dviju faza iz svake cijevi za svaki ispitni uvjet i analizira odabranim postupkom. Ukupna količina tvari prisutna u obje faze izračunava se i uspoređuje s količinom tvari koja je prvobitna uvedena.

Vodenu fazu treba uzorkovati postupkom kojim se minimalizira rizik uključivanja tragova n-oktanola: za uzimanje uzorka vodene faze može se koristiti staklena šprica s izmjenljivom iglom. Šprica mora najprije biti djelomično napunjena zrakom. Zrak treba nježno istiskivati dok se igla uvodi kroz sloj n-oktanola. Odgovarajući volumen vodene faze uvuče se u špricu. Šprica se brzo izvadi iz otopine i igla odvoji. Sadržaj šprice sada se može koristiti kao uzorak vode. Koncentraciju u dvije odvojene faze poželjno je utvrditi metodom koja posebno odgovara za dotičnu tvar. Analitičke metode koje bi mogle biti primjerene su, primjerice:

— fotometričke metode,

— plinska kromatografija,

— visokoučinkovita tekućinska kromatografija.

1.6.3. **Metoda HPLC**

1.6.3.1. *Priprema*

Uređaj

Potreban je tekućinski kromatograf opremljen crpkom sa stalnim protokom i odgovarajućim uređajem za detekciju. Preporuča se upotreba ventila za ubrizgavanje s petljama za ubrizgavanje. Prisutnost polarnih grupa u stacionarnoj fazi može ozbiljno ugroziti rad kolone kromotografa. Stoga bi stacionarna faza trebala sadržavati minimalni postotak polarnih grupa (11). Mogu se upotrebljavati trgovačka pakiranja mikro-čestica inverzne faze ili gotove kolone. Između sustava ubrizgavanja i analitičke kolone može se postaviti sigurnosna kolona.

Mobilna faza

Za pripremanje otapala za eluiranje upotrebljavaju se metanol kvalitete predviđene za HPLC i voda kvalitete previđene za HPLC, a otapalo se prije upotrebe otplinjava. Treba primijeniti izokratičnu eluaciju. Treba upotrijebiti omjere metanol/voda s minimalnim sadržajem vode od 25 %. Obično je omjer mješavine metanola i vode 3:1 (v/v) zadovoljavajući za eluiranje spojeva s vrijednošću log P 6 unutar jednog sata kod brzine protoka od 1 ml/min. Za spojeve koji imaju viši log P možda će trebati skratiti vrijeme eluiranja (i vrijeme eluiranja referentnih spojeva) smanjivanjem polariteta mobilne faze ili duljine kolone.

Kod metode HPLC, tvari jako niske topljivosti u n-oktanolu imaju tendenciju dati neuobičajeno male vrijednosti log P_{ow}; vršne vrijednosti takvih spojeva ponekad prate frontu otapala. To je vjerojatno zato što je postupak razdjeljivanja prespor da bi se ravnoteža postigla u vremenu koje obično treba za odvajanje kromatografijom HPLC. Stoga bi se do pouzdane vrijednosti učinkovito moglo doći snižavanjem brzine protoka i/ili smanjivanjem omjera metanol/voda.

▼B

Ispitivani i referentni spojevi trebali bi biti topljivi u mobilnoj fazi u koncentracijama koje su dovoljne za njihovu detekciju. Samo u izuzetnim slučajevima s mješavinom metanola i vode smiju se koristiti aditivi, jer aditivi mijenjaju svojstva kolone. Za kromatograme s aditivima obvezno je rabiti posebnu kolonu istog tipa. Ako mješavina metanol-voda nije prikladna, mogu se koristiti mješavine drugih otapala i vode, npr. etanol-voda ili acetonitril-voda.

pH eluensa od kritične je važnosti za ionizirajuće spojeve. pH vrijednost mora biti u radnom području pH vrijednosti kolone, što je obično između 2 i 8. Preporuča se puferiranje. Treba paziti da se izbjegne taloženje soli i propadanje kolone, do čega dolazi kod nekih organskih faza/pufer mješavina. Kod stacionarnih faza koje se temelje na silicijevom dioksidu s pH vrijednošću iznad 8, ne preporuča se mjerenje kromatografijom HPLC jer upotreba alkalne mobilne faze može brzo uzrokovati slabije funkcioniranje kolone.

Rastvori

Referentni spojevi trebali bi biti što je moguće čišći. Spojevi koji se koriste za ispitivanje ili u svrhu kalibracije otapaju se, po mogućnosti, u mobilnoj fazi.

Ispitni uvjeti

Za vrijeme mjerenja, temperatura ne bi smjela varirati za više od ± 2 K.

1.6.3.2. **Mjerenje**

Izračun mrtvog vremena t_o

Mrtvo vrijeme t_o može se odrediti upotrebom homolognog niza (npr. n-alkil metil ketoni) ili nezadržanih organskih spojeva (npr. tiourea ili formamid). Za izračun mrtvog vremena t_o primjenom homolognog niza, ubrizgava se set od najmanje sedam članova homolognog niza i utvrđuju se njihova vremena zadržavanja. Sirovi podaci o vremenima zadržavanja $t_{r\,(nc\,+\,1)}$ ucrtavaju se kao funkcija vremena $t_{r(nc)}$, i određuju se sjecište a i kosina b regresijske jednadžbe:

$$t_{r(nc\,+\,1)} = a + b\ t_{r(nc)}$$

(n_c = broj atoma ugljika). Dakle, mrtvo vrijeme t_o određeno je jednadžbom:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Kalibracijska krivulja

Sljedeći je korak konstruiranje korelacijske krivulje vrijednosti log k u odnosu na log p za odgovarajuće referentne spojeve. U praksi, set od 5 do 10 standardnih referentnih spojeva čija je vrijednost log p oko očekivanog područja istodobno se ubrizgava te se određuju vremena zadržavanja, poželjno na integratoru za bilježenje rezultata spojenom na sustav za detekciju. Odgovarajući logaritmi faktora kapaciteta, log k, izračunavaju se i ucrtavaju kao funkcija vrijednosti log p određena metodom protresanja tikvice. Kalibracija se obavlja u redovitim intervalima, najmanje jednom dnevno, kako bi se mogle uzeti u obzir eventualne promjene u funkcioniranju kolone.

Utvrđivanje faktora kapaciteta ispitivane tvari

Ispitivana tvar ubrizga se u najmanju moguću količinu mobilne faze. Odredi se vrijeme zadržavanja (dva puta), čime se omogućuje izračun faktora kapaciteta k. Iz korelacijske krivulje referentnih spojeva može se interpolirati koeficijent razdjeljenja ispitivane tvari. Za jako male i jako velike koeficijente razdjeljenja, ekstrapolacija je neophodna. U tim slučajevima treba voditi računa o granicama pouzdanosti linije regresije.

2. **PODACI**

Metoda protresanja tikvice

Pouzdanost utvrđenih vrijednosti P može se ispitati uspoređivanjem srednjih vrijednosti dvostrukih određivanja i sveukupne srednje vrijednosti.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— kad metode nisu primjenljive (npr. površinski aktivni materijali), treba osigurati izračunanu ili procijenjenu vrijednost koja se temelji na pojedinačnim topljivostima n-oktanola i vode

— svi podaci i napomene relevantne za tumačenje rezultata, posebno s obzirom na nečistoće i fizikalno stanje tvari.

Za metodu protresanjem tikvice:

— rezultat prethodne procjene, ako je provedena,

— temperatura određivanja,

— podaci o analitičkim postupcima koji su primijenjeni u određivanju koncentracija,

— vrijeme i brzina centrifugiranja, ako je primijenjeno,

▼B

— izmjerene koncentracije u obje faze za svako određivanje (to znači da u izvješće treba unijeti ukupno 12 koncentracija),

— težina ispitivane tvari, volumen svake faze koja je upotrijebljena u svakoj ispitnoj posudi i ukupna izračunana količina ispitivane tvari prisutna u svakoj fazi nakon uravnoteženja,

— izračunane vrijednosti koeficijenta razdjeljenja (P) i srednja vrijednost za svaki set ispitnih uvjeta kao i srednja vrijednost za sva određivanja. U izvješću treba navesti svaku indikaciju zavisnosti koncentracije o koeficijentu razdjeljenja,

— treba navesti standardno odstupanje pojedinačnih vrijednosti P od njihove srednje vrijednosti,

— srednja vrijednost P iz svih određivanja mora biti izražena i njezinim logaritmom (baza 10),

— izračunati teoretski P_{ow} ako je ta vrijednost utvrđena ili ako je izmjerena vrijednost > 10^4,

— pH vrijednost vode koja je upotrijebljena i pH vodene faze tijekom pokusa,

— ako su korišteni puferi, obrazloženje za upotrebu pufera umjesto vode, sastav, koncentracija i pH vrijednost pufera, pH vrijednost vodene faze prije i poslije pokusa.

Za metodu kromatografijom HPLC:

— rezultat prethodne procjene, ako je provedena,

— ispitivanja i referentne tvari, i njihova čistoća,

— temperaturno područje određivanja,

— pH vrijednost na kojoj su određivanja provedena,

— podaci o analitičkoj i sigurnosnoj koloni, mobilnoj fazi i srednjim vrijednostima detekcije,

— podaci o zadržavanju i vrijednosti log P koje se za referentne spojeve upotrijebljene u kalibraciji spominju u literaturi,

— pojedinosti o prilagođenoj liniji regresije (log k u odnosu na log P),

— podaci o prosječnom zadržavanju i interpolirana vrijednost log P za ispitivani spoj,

— opis opreme i radnih uvjeta,

— profili eluiranja,

— količine ispitivane i referentne tvari uvedene u kolonu,

— mrtvo vrijeme i način na koji je mjereno.

▼B

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Testing Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, str. 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, str. 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, str. 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, str. 1.

(8) J.E. Haky and A. M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, str. 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, str. 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, str. 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, str. 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, str. 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of Partition Coefficients – Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, str. 1459.

(16) A.Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, str. 525.

(17) C.Hansch, A.Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, str. 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, str. 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, str. 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base1, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, str. 615.

▼B

Dodatak 1.

Metode izračuna/procjene

UVOD

Općeniti uvod u metode, podaci i primjeri izračuna navedeni su u priručniku o metodama procjene kemijskih svojstava „Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a)"

Izračunane vrijednosti P_{ow} mogu se koristiti:

— za donošenje odluke o tome koja je eksperimentalna metoda primjerena (područje metode protresanjem tikvice: log P_{ow}: – 2 do 4, područje metode HPLC: log P_{ow}: 0 do 6),

— za odabir primjerenih ispitnih uvjeta (npr. referentne tvari za postupke kromatografije HPLC, omjer volumena n-oktanol/voda za metodu protresanjem tikvice),

— kao vlastita provjera radi otkrivanja eventualnih pogrešaka u pokusu koju provodi sam laboratorij,

— kao procijenjene vrijednosti P_{ow} u slučajevima kad iz tehničkih razloga nije moguće primijeniti eksperimentalne metode.

METODA PROCJENE

Preliminarna procjena koeficijenta razdjeljenja

Vrijednost koeficijenta razdjeljenja može se procijeniti pomoću topljivosti ispitivanih tvari u čistim otapalima.

Tada je:

$$P_{\text{procijenjeni}} = \frac{\text{zasićenje } c_{n\,-\,\text{oktanol}}}{\text{zasićenje } c_{\text{voda}}}$$

METODE IZRAČUNA

Načelo metoda izračuna

Sve metode izračuna temelje se na formalnoj fragmentaciji molekule na odgovarajuće pod-strukture za koje su prirasti vrijednosti log P_{ow} poznati. Log P_{ow} cijele molekule tada se izračunava kao zbroj odgovarajućih vrijednosti njezinih fragmenata uvećan za zbroj korektivnih članova za intramolekulske interakcije.

Postoje popisi konstanti fragmenata i korektivnih članova (b)(c)(d)(e) od kojih se neki redovito ažuriraju (b).

Kriteriji kvalitete

Općenito, što je složeniji spoj koji se proučava, pouzdanost metode izračuna je manja. Kad se radi o jednostavnim molekulama male molekulske težine i molekulama koje sadrže jednu ili dvije funkcionalne skupine, između rezultata različitih metoda fragmentacije i izmjerene vrijednosti može se očekivati odstupanje od 0,1 do 0,3 log P_{ow} jedinica. Kad se radi o složenijim molekulama, margina greške može biti veća. To će ovisiti o pouzdanosti i dostupnosti konstanti fragmenata, kao i o sposobnosti prepoznavanja intramolekulskih interakcija (npr. vodikove veze) i pravilne primjene korektivnih članova (nije toliki problem kod računalnog programa CLOGP-3) (b). Kad se radi o ionizirajućim spojevima, važno je uzeti u obzir točan naboj ili stupanj ionizacije.

▼B

Postupci izračuna

Hanschova π-metoda

Konstanta originalnog supstituenta, π, koju su uveli Fujira i ostali (f) definira se kao:

$$\pi_x = \log P_{ow} (PhX) - \log P_{ow} (PhH)$$

gdje je P_{ow} (PhX) koeficijent razdjeljenja aromatskog derivata, a P_{ow} (PhH) koeficijent razdjeljenja roditeljskog spoja

(npr. $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71$).

Prema definiciji π-metoda primjenljiva je pretežito na aromatsku supstituciju. Prikupljene su π-vrijednosti za velik broj supstituenata (b)(c)(d). Pomoću njih se izračunava log P_{ow} za aromatske molekule i podstrukture.

Rekkerova metoda

Prema Rekkeru (g), vrijednost log P_{ow} izračunava se kako slijedi:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interaktivni članovi})$$

gdje f_i predstavlja konstante različitih molekulskih fragmenata, a a_1 učestalost njihovog pojavljivanja u molekuli koja se ispituje. Korektivni članovi mogu se izraziti kao integralni višekratnik samo jedne konstante C_m (takozvane magične konstante). Konstante fragmenata, f_i i C_m određene su iz popisa koji sadrži 1 054 ekperimentalnu vrijednost P_{ow} (825 spojeva) primjenom višestruke regresijske analize (c)(h). Određivanje faktora interakcije provodi se u skladu s utvrđenim pravilima kako su opisana u literaturi (e)(h)(i).

Hansch-Leova metoda

Prema Hanschu i Leu (c), vrijednost log P_{ow} izračunava se iz:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

gdje f_i predstavlja konstante različitih molekulskih fragmenata, F_j korektivne faktore, a a_i, b_j predstavljaju njihovu učestalost pojavljivanja. Izvedeni iz ekperimentalnih vrijednost P_{ow}, popis atomskih i grupnih fragmentiranih vrijednosti i popis korektivnih članova F_j (tzv. faktori) određeni su putem pokušaja i pogreške. Korektivni članovi svrstani su u nekoliko različitih klasa (a)(c). Prilično je složeno i vremenski zahtjevno uzeti u obzir sva pravila i korektivne članove. Razvijeni su programski paketi (b).

Kombinirana metoda

Izračun vrijednost log P_{ow} složenih molekula moguće je znatno unaprijediti ako se molekula rasiječe na veće podstrukture za koje su pouzdane vrijednosti log P_{ow} dostupne bilo iz tablica (b)(c) ili iz vlastitih mjerenja. Takve fragmente (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) tada je moguće kombinirati s Hanschovim π-vrijednostima ili s Rekkerovim i Leovim konstantama fragmenata.

Napomene

i. Metode izračuna mogu se primijeniti na djelomično ili potpuno ionizirane spojeve samo kad je moguće uzeti u obzir potrebne korektivne faktore;

▼B

ii. Ako se može pretpostaviti prisutnost intramolekulske vodikove veze, obvezno treba dodati odgovarajuće korektivne članove (približno + 0,6 do + 1,0 log P_{ow} jedinica) (a). Pokazatelji prisutnosti tih veza dobivaju se stereo modelima ili spektroskopskim podacima o molekuli;

iii. Ako je nekoliko tautomernih oblika moguće, najvjerojatniji oblik treba uzeti kao osnovu izračuna;

iv. Revizije popisa konstanti fragmenata treba pažljivo pratiti.

Izvješće

Kad se koriste metode izračuna/procjene, izvješća o ispitivanju, ako je moguće, moraju sadržavati sljedeće informacije:

— opis tvari (mješavina, nečistoće itd.),

— indikaciju eventualne intramolekulske vodikove veze, disocijacije, naboja ili drugih neuobičajenih učinaka (npr. tautomerija),

— opis metode izračuna,

— identifikacija ili porijeklo baze podataka,

— pojedinosti o izboru fragmenata,

— sveobuhvatna dokumentacija izračuna.

LITERATURA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971., vol. 71, str. 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979., vol. 14, str. 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964., vol. 86, str. 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, NewYork, 1977., vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983., vol. 12, str. 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984., Symposium Series 255, str. 225.

▼B

Dodatak 2.

Preporučene referentne tvari za metodu HLPC

Br.	Referentna tvar	log P_{ow}	pKa
1	2- butanon	0,3	
2	4-acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilalkohol	1,1	
6	p-metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksi octena kiselina	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-metilbenzil alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3- nitrobenzojeva kiselina	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzen	1,9	
18	Cinaminski alkohol	1,9	
19	Benzojeva kiselina	1,9	pKa = 4,19
20	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Cinaminska kiselina	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoat	2,1	
24	Benzen	2,1	
25	3-metilbenzojeva kiselina	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Tri-kloretilen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilbenzoat	2,6	
30	2,6-diklorobenzonitril	2,6	
31	3-klorobenzojeva kiselina	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloroanilin	2,8	
35	Klorobenzen	2,8	
36	Alil-fenileter	2,9	
37	Bromobenzen	3,0	

▼B

Br.	Referentna tvar	log P_{ow}	pKa
38	Etilbenzen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-diklorobenzen	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalen	3,6	
45	Fenilbenzoat	3,6	
46	Izopropilbenzen	3,7	
47	2,4,6-triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzilbenzoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sec. butilfenol	4,1	
51	1,2,4-triklorobenzen	4,2	
52	Dodekanska kiselina	4,2	
53	Difenileter	4,2	
54	n-butilbenzen	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Floranten	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-difenilpiridin	4,9	
59	Trifenilamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Ostale referentne tvari niskog log P_{ow}		
1	Nikotinska kiselina	– 0,07	

▼B

A.9. **PLAMIŠTE**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Prije provođenja ovog ispitivanja korisno je raspolagati preliminarnim informacijama o zapaljivosti tvari koja se ispituje. Ispitni postupak primjenjuje se na tekuće tvari čije je pare moguće zapaliti izvorom zapaljenja. Ispitne metode navedene u ovom tekstu pouzdane su samo za područja plamišta koja su pojedinačno navedena za svaku metodu.

Kod odabira metode koja će se primijeniti treba uzeti u obzir mogućnost kemijske reakcije između tvari i posude za uzorak.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Plamište je najniža temperatura, ispravljena na tlak od 101,325 kPa, kod koje, u uvjetima utvrđenim u ispitnoj metodi, tekućina evolvira toliku količinu para da u ispitnoj posudi nastane zapaljiva mješavina pare i zraka.

Jedinice: °C

$t = T - 273{,}15$

(t u °C, a T u K)

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari nije potrebno upotrebljavati kod svakog istraživanja nove tvari. One bi trebale služiti prvenstveno za povremenu provjeru primijenjene metode i omogućiti usporedbu s rezultatima dobivenim drugim metodama.

1.4. NAČELO METODE

Tvar se stavi u ispitnu posudu i zagrijava ili hladi do temperature ispitivanja u skladu s postupkom opisanim u pojedinoj ispitnoj metodi. Probe zapaljenja provode se kako bi se utvrdilo hoće li se uzorak zapaliti na temperaturi ispitivanja ili neće.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

1.5.1. **Ponovljivost**

Ponovljivost varira u skladu s područjem plamišta i primijenjenoj ispitnoj metodi; maksimalno 2 °C.

1.5.2. **Osjetljivost**

Osjetljivost ovisi o primijenjenoj ispitnoj metodi.

1.5.3. **Specifičnost**

Posebnost nekih ispitnih metoda ograničena je na određena područja plamišta i ovisi o podacima specifičnim za pojedinu tvar (npr. velika viskoznost).

▼B

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Pripravci**

Uzorak ispitivane tvari stavi se u ispitni uređaj prema 1.6.3.1. i/ili 1.6.3.2.

Radi sigurnosnih razloga, za energetske i toksične tvari preporuča se primjena metode kod koje se koristi mala količina uzorka, približno 2 cm^3.

1.6.2. **Ispitni uvjeti**

Do mjere u kojoj je to moguće iz sigurnosnih razloga, uređaj treba postaviti u položaj zaštićen od strujanja zraka.

1.6.3. **Provođenje ispitivanja**

1.6.3.1. *Metoda ravnoteže*

Vidjeti norme: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Metoda neravnoteže*

Uređaj Abel:

Vidjeti norme: BS 2000 dio 170., NF M07-011, NF T66-009.

Uređaj Abel-Pensky:

Vidjeti norme: EN 57, DIN 51755 dio 1. (za temperature od 5 do 65 °C), DIN 51755 dio 2. (za temperature ispod 5 °C), NF M07-036.

Uređaj Tag:

Vidjeti normu ASTM D 56.

Uređaj Pensky-Martens:

Vidjeti norme: ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Napomene:

Ako se metodom neravnoteže iz 1.6.3.2. utvrdi da je plamište na temperaturi 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ili 55 ± 2 °C, to treba potvrditi metodom ravnoteže koristeći isti uređaj.

U svrhu prijavljivanja smiju se koristiti samo one metode koje daju temperaturu plamišta.

Za određivanje plamišta viskoznih tekućina (boje, gume i slično) koje sadrže otapala dozvoljeno je koristiti samo uređaj i ispitne metode prikladne za određivanje plamišta viskoznih tekućina.

Vidjeti norme: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 dio 1.

▼B

2. **PODACI**

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— treba navesti primijenjenu metodu kao i eventualna odstupanja,

— rezultate i sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

Nema ih.

▼B

A.10. **ZAPALJIVOST (KRUTINE)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Prije provođenja ovog ispitivanja korisno je raspolagati preliminarnim informacijama o potencijalno eksplozivnim svojstvima tvari.

Ovo ispitivanje treba primjenjivati samo na tvari u obliku praha, granula ili paste.

Kako se ne bi obuhvatile sve tvari koje gore već samo one koje gore brzo ili one čije ponašanje kod zapaljenja je na bilo koji način izrazito opasno, lako zapaljivim tvarima smatraju se samo one tvari čija brzina gorenja premašuje određenu graničnu vrijednost.

Usijanost koja se proširi kroz metalnu prašinu može biti izrazito opasna jer se takav požar teško gasi. Metalnu prašinu treba smatrati lako zapaljivom ako podržava širenje usijanja cijelom masom u određenom vremenu.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Vrijeme gorenja izraženo u sekundama

1.3. REFERENTNE TVARI

Nisu navedene.

1.4. NAČELO METODE

Tvar se oblikuje kao neprekinuta traka ili pruga od praha dugačka oko 250 mm, te se provodi preliminarni test probira kako bi se odredilo dolazi li kod zapaljenja na plinskom plamenu do širenja plamena ili do tinjanja. Ako se plamen u određenom vremenu proširi na preko 200 mm u dužinu, treba provesti potpuni program ispitivanja kako bi se odredila brzina gorenja.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nisu navedeni.

▼B

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Preliminarni test probira**

Tvar se oblikuje na nezapaljivoj, neporoznoj ploči slabe termičke provodljivosti kao neprekinuta traka ili pruga od praha dugačka oko 250 mm, široka 20 mm i visoka 10 mm. Plamen iz plinskoga gorača (minimalnog promjera 5 mm) drži se na jednom kraju pruge od praha sve dok se prah ne zapali ili najduže dvije minute (pet minuta za prah metala ili metalnih legura). Treba pratiti širi li se gorenje uzduž 200 mm dugačke pruge u ispitnom razdoblju od 4 minute (ili 40 minuta za metalnu prašinu). Ako se u ispitnom razdoblju od 4 minute (ili 40 minuta) tvar nije zapalila niti se gorenje nastavilo bilo kao plamen ili kao tinjanje uzduž 200 mm dugačke pruge, tvar ne treba smatrati lako zapaljivom i daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se širenje gorenja tvari nastavi na način da 200 mm dugačka pruga izgori za manje od četiri minute, ili manje od 40 minuta za metalni prah, treba provesti postupak opisan dalje u tekstu (točka 1.6.2. i dalje).

1.6.2. **Ispitivanje brzine gorenja**

1.6.2.1. *Priprema*

Praškaste ili zrnate tvari rahlo se napune u kalup dugačak 250 mm, trokutastog presjeka unutarnje visine 10 mm i širine 20 mm. S obje strane kalupa uzdužno su montirana dva metalna lima kao bočni graničnici koji su za 2 mm viši od gornjeg ruba trokutastog presjeka (slika). Kalup se tri puta spusti s visine od 2 cm na čvrstu podlogu. Po potrebi kalup treba nadopuniti. Bočni graničnici se zatim skinu, a višak tvari sastruže. Na vrh kalupa postavi se nezapaljiva, neporozna ploča slabe toplinske provodljivosti, uređaj se preokrene naopako i kalup se odstrani.

Tvari u obliku paste nanesu se na nezapaljivu, neporoznu ploču slabe toplinske provodljivosti u obliku užeta dugačkog 250 mm, poprečnog presjeka oko 1 cm^2.

1.6.2.2. *Ispitni uvjeti*

Kad se radi o tvari koja je osjetljiva na vlagu, ispitivanje treba provesti što je moguće brže nakon što je tvar izvađena iz spremnika.

1.6.2.3. *Provođenje ispitivanja*

Složite u digestor hrpicu uzorka na način da kroz njega struji zrak.

Brzina strujanja zraka trebala bi biti dovoljna da se spriječi istjecanje para u laboratorij i ne bi je se smjelo mijenjati tijekom ispitivanja. Strujanjem zraka oko uređaja mora se formirati zračna zavjesa.

Plamen iz plinskoga gorača (najmanje 5 mm u promjeru) koristi se za paljenje hrpice s jednog kraja. Kad tvar izgori u duljini od 80 mm, mjeri se brzina gorenja na sljedećih 100 mm.

▼B

Ako se pozitivan rezultat ne zamijeti ranije, ispitivanje se provodi šest puta, svaki put na čistom limu za hlađenje.

2. **PODACI**

Za procjenu relevantno je vrijeme gorenja iz preliminarnog testa probira (1.6.1.) i najkraće vrijeme gorenja u najviše šest ispitivanja (1.6.2.3.)

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— opis tvari koja se ispituje, njezino fizikalno stanje uključujući sadržaj vlage

— rezultati iz preliminarnog testa probira i ispitivanja brzine gorenja, ako je to ispitivanje provedeno,

— sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

3.2. TUMAČENJE REZULTATA

Tvari u obliku praha, granula ili paste smatraju se lako zapaljivima ako je vrijeme gorenja prilikom bilo kojih testiranja provedenih sukladno postupku ispitivanja iz 1.6.2. kraće od 45 sekundi. Prah metala ili metalnih legura smatra se lako zapaljivim ako se može zapaliti a plamen ili zona reakcije se proširi po cijelom uzorku u roku od 10 minuta ili manje.

4. **REFERENCE**

NF T 20-042 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

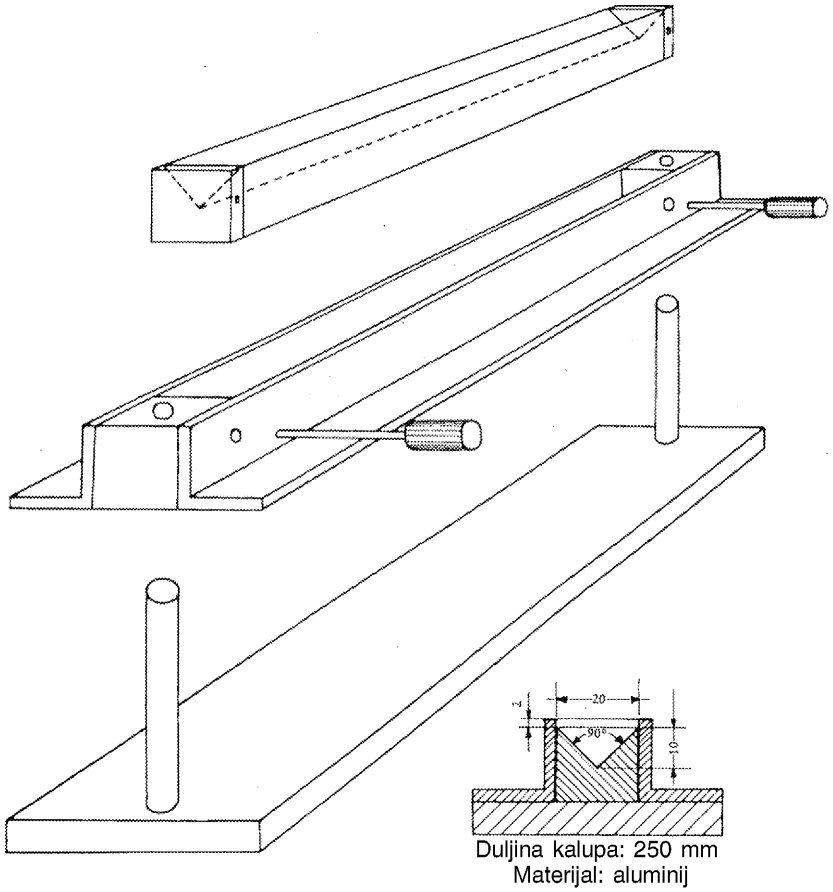
▼B

Dodatak

Slika

Kalup i pribor za pripremu hrpice

(Sve dimenzije izražene su u milimetrima)



▼B

A.11. **ZAPALJIVOST (PLINOVI)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Ovom metodom moguće je odrediti jesu li plinovi pomiješani sa zrakom na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) i atmosferskom tlaku zapaljivi i, ako jesu, u kojem području koncentracija. Mješavine sve većih koncentracija ispitivanog plina i zraka izlažu se električnoj iskri te se prati dolazi li do zapaljenja.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Područje zapaljivosti je područje koncentracija između donje i gornje granice eksplozije. Donja i gornja granica eksplozivnosti su granične koncentracije zapaljivog plina u smjesama sa zrakom na kojima ne dolazi do širenja plamena.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nisu navedene.

1.4. NAČELO METODE

Koncentracija plina u zraku postupno se povećava, te se kod svakog povećanja izlaže električnoj iskri.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nisu navedeni.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Uređaj**

Ispitna posuda je uspravni stakleni cilindar unutarnjeg promjera najmanje 50 mm i minimalne visine 300 mm. Elektrode za paljenje međusobno su odvojene od 3 do 5 mm, a postavljene su 60 mm iznad dna cilindra. Cilindar ima otvor za oslobađanje tlaka. Uređaj mora imati zaštitni plašt kako bi se ograničila eventualna šteta od eksplozije.

Kao izvor zapaljenja koristi se indukcijska iskra koja traje 0,5 sek., a nastaje visokonaponskim transformatorom izlaznog napona 10 do 15 kV (maksimalne ulazne snage 300 W). Primjer odgovarajućeg uređaja opisan je u referenci (2).

1.6.2. **Ispitni uvjeti**

Ispitivanje treba provoditi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

▼B

1.6.3. **Provođenje ispitivanja**

Dozirnim crpkama u stakleni cilindar uvodi se poznata koncentracija plina u zraku. Kroz mješavinu se pušta iskra i promatra se hoće li se plamen odvojiti od izvora zapaljenja i neovisno širiti ili ne. Koncentracija plina mijenja se po 1 % vol. dok ne dođe do zapaljenja kako je gore opisano.

Ako kemijska struktura plina ukazuje da bi mogao biti nezapaljiv, a sastav stehiometrijske mješavine sa zrakom može se izračunati, tada postupno u rasponu od 1 % treba ispitivati samo mješavine u području od 10 % ispod do 10 % iznad stehiometrijskog sastava.

2. **PODACI**

Pojava širenja plamena jedini je relevantan podatak za određivanje ovog svojstva.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— opis i dimenzije uređaja koji se koristi,

— temperatura na kojoj je ispitivanje provedeno,

— ispitane koncentracije i dobiveni rezultati,

— rezultat ispitivanja: nezapaljivi plin ili lako zapaljivi plin,

— ako je zaključeno da je plin nezapaljiv, tada treba navesti područje koncentracija u kojem je plin postupno ispitivan po 1 %,

— sve informacije i napomene relevantne za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) NF T 20-041 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann „Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen”. Chem.-Ing.- Tech., 1984, vol. 56, 2, 126-127., T. Redeker und H.Schacke, str. 126-127.

▼B

A.12. **ZAPALJIVOST (U DODIRU S VODOM)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Ovom metodom moguće je odrediti razvijaju li se kod reakcije tvari s vodom ili vlažnim zrakom opasne količine plina ili plinova koji mogu biti lako zapaljivi.

Ova se ispitna metoda može primijeniti i na krute i na tekuće tvari. Ova metoda nije primjenljiva na tvari koje se spontano pale u dodiru sa zrakom.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Lako zapaljive: tvari koje u dodiru s vodom ili vlažnim zrakom razvijaju lako zapaljive plinove u opasnim količinama brzinom od najmanje 1 litra/kg na sat.

1.3. NAČELO METODE

Tvar se ispituje postupno kako je opisano dalje u tekstu; ako u bilo kojoj fazi dođe do zapaljenja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako je poznato da tvar ne reagira burno s vodom, treba odmah prijeći na fazu 4. (1.3.4.)

1.3.1. **Faza 1.**

Ispitivana tvar postavlja se u korito koje sadrži destiliranu vodu na 20 °C i bilježi se hoće li se razvijeni plin zapaliti ili ne.

1.3.2. **Faza 2.**

Ispitivana tvar postavlja se na filtar papir koji pluta na površini posude koja sadrži destiliranu vodu na 20 °C i bilježi se hoće li se razvijeni plin zapaliti ili ne. Filtar papir služi samo da bi se tvar održala na mjestu, čime se povećava vjerojatnost zapaljenja.

1.3.3. **Faza 3.**

Ispitivana tvar složi se u hrpicu otprilike 2 cm visoku i 3 cm u promjeru. Na hrpicu se doda nekoliko kapi vode i bilježi se hoće li se razvijeni plin zapaliti ili ne.

1.3.4. **Faza 4.**

Ispitivana tvar miješa se s destiliranom vodom na 20 °C, brzina razvijanja plina mjeri se u razdoblju od sedam sati, u polusatnim intervalima. Ako se plin razvija nepravilnom brzinom, ili brzinom koja se povećava, trajanje mjerenja nakon sedam sati treba produžiti na maksimalno pet dana. Ako brzina u bilo koje vrijeme premaši 1 litru/kg na sat, ispitivanje treba zaustaviti.

▼B

1.4. REFERENTNE TVARI

Nije navedeno.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nije navedeno.

1.6. OPIS METODA

1.6.1. **Faza 1.**

1.6.1.1. *Ispitni uvjeti*

Ispitivanje se provodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.1.2. *Provođenje ispitivanja*

Malu količinu (približno 2 mm u promjeru) ispitivane tvari treba staviti u korito koje sadrži destiliranu vodu. Treba zabilježiti i. razvija li se plin i ii. dolazi li do zapaljenja. Ako dođe do zapaljenja plina, daljnje ispitivanje tvari nije potrebno jer se tvar smatra opasnom.

1.6.2. **Faza 2.**

1.6.2.1. *Uređaj*

Filtar papir pluta na površini destilirane vode u bilo kojoj prikladnoj posudi, npr. posudi za isparavanje promjera 100 mm.

1.6.2.2. *Ispitni uvjeti*

Ispitivanje se provodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.2.3. *Provođenje ispitivanja*

Mala količina ispitivane tvari (približno 2 mm u promjeru) stavi se na sredinu filtar papira. Treba zabilježiti i. razvija li se plin i ii. dolazi li do zapaljenja. Ako dođe do zapaljenja plina, daljnje ispitivanje tvari nije potrebno jer se tvar smatra opasnom.

1.6.3. **Faza 3.**

1.6.3.1. *Ispitni uvjeti*

Ispitivanje se provodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.3.2. *Provođenje ispitivanja*

Ispitivana tvar složi se u hrpicu približno 2 cm visoku i 3 cm u promjeru s udubljenjem na vrhu. U udubljenje se doda nekoliko kapi vode i bilježi se i. razvija li se plin i ii. dolazi li do zapaljenja. Ako dođe do zapaljenja plina, daljnje ispitivanje tvari nije potrebno jer se tvar smatra opasnom.

▼B

1.6.4. **Faza 4.**

1.6.4.1. *Uređaj*

Uređaj se postavlja kako prikazuje slika.

1.6.4.2. *Ispitni uvjeti*

Pregledati ima li u spremniku za ispitivanu tvar praha < 500 μm (veličina čestice). Ako prah čini više od 1 % (m/m) ukupne količine, ili ako se uzorak mrvi, tada prije ispitivanja cijelu količinu tvari treba samljeti u prah kako bi se uzelo u obzir smanjenje veličine čestica tijekom skladištenja i rukovanja; u protivnom tvar treba ispitati kako je primljena. Ispitivanje treba provesti na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) i pod atmosferskim tlakom.

1.6.4.3. *Provođenje ispitivanja*

10 do 20 ml vode stavi se u lijevak za dokapavanje u uređaju, a 10 g tvari u konusnu tikvicu. Volumen plina koji se razvija može se mjeriti svim prikladnim sredstvima. Slavina lijevka otvori se kako bi voda ušla u konusnu tikvicu i započinje mjerenje vremena štopericom. Nastajanje plina mjeri se svakog sata tijekom sedmosatnog razdoblja. Ako je u tom razdoblju nastajanje plina nepravilno ili ako se brzina nastajanja plina povećava, mjerenja treba nastaviti do najviše pet dana. Ako, u bilo koje vrijeme mjerenja, brzina nastajanja plina prijeđe 1 litru/kg po satu, pokus treba prekinuti. Ovaj se pokus izvodi tri puta.

Ako kemijski identitet plina nije poznat, plin treba analizirati. Ako plin sadrži lako zapaljive komponente, a nije poznato je li cijela mješavina lako zapaljiva, treba pripraviti mješavinu istog sastava i ispitati je ispitnom metodom A.11.

2. **PODACI**

Smatra se da je tvar opasna ako:

— u bilo kojoj fazi ispitnog postupka dođe do spontanog zapaljenja,

ili

— do nastajanja zapaljivog plina dođe brzinom većom od 1 litre/kg tvari na sat.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— podatke o eventualnoj početnoj pripremi ispitivane tvari,

▼B

— rezultati pokusa (faze 1., 2., 3. i 4.),

— kemijski sastav nastalog plina,

— brzina nastajanja plina ako se provodi faza 4. (1.6.4.),

— svi dodatni podaci relevantni za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

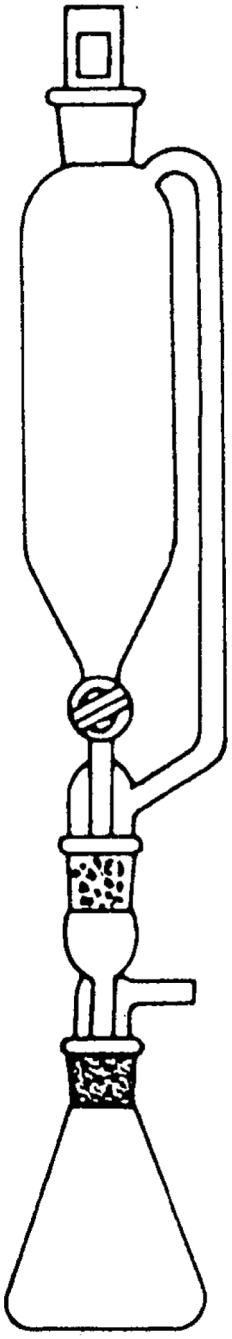
(2) NF T 20-040 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Dodatak

Slika

Uređaj



▼B

A.13. PIROFORNA SVOJSTVA KRUTINA I TEKUĆINA

1. METODA

1.1. UVOD

Ovaj ispitni postupak primjenljiv je na krute i tekuće tvari koje će se u malim količinama spontano zapaliti ubrzo nakon dodira sa zrakom na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

Tvari koje prije nego se zapale trebaju biti izložene zraku satima ili danima na sobnoj temperaturi ili na povišenim temperaturama nisu obuhvaćene ovom ispitnom metodom.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Smatra se da tvari imaju piroforna svojstva ako su zapaljive ili uzrokuju pougljenjivanje u uvjetima opisanim u 1.6.

Možda treba ispitati i samozapaljivost tekućina primjenom metode A.15. Temperatura samozapaljenja (tekućine i plinovi).

1.3. REFERENTNE TVARI

Nije navedeno.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Tvar, bilo krutina ili tekućina, dodaje se inertnom nosaču i drži u dodiru sa zrakom na sobnoj temperaturi tijekom pet minuta. Tekuće tvari koje se ne zapale upiju se na filtar papir i pet minuta izlažu zraku na temperaturi okoline (oko 20 °C). Ako se krutina ili tekućina zapali, ili ako tekućina zapali ili pougljeni filtar papir, tvar se smatra pirofornom.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Ponovljivost: zbog sigurnosnih razloga, dovoljan je samo jedan rezultat da bi se tvar smatrala pirofornom.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Uređaj**

Porculanska šalica od oko 10 cm u promjeru napuni se dijatomejskom zemljom do visine od oko 5 mm na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

Napomena:

Dijatomejska zemlja ili bilo koja druga usporediva inertna tvar koju je jednostavno nabaviti uzima se kao reprezentativni uzorak tla po kojem se u slučaju nezgode može izliti ispitivana tvar.

Za ispitivanje tekućina koje nisu zapaljive u dodiru sa zrakom kada su u dodiru s inertnim nosačem potreban je suhi filtar papir.

▼B

1.6.2. **Provođenje ispitivanja**

(a) *Praškaste krutine*

1 do 2 cm^3 tvari koja se ispituje isipa se s visine od oko 1 m na nezapaljivu površinu, te se promatra hoće li se tvar zapaliti tijekom sipanja ili u roku od pet minuta nakon toga.

Pokus se provodi šest puta ako prije ne dođe do zapaljenja;

(b) *tekućine*

Oko 5 cm^3 tekućine koja se ispituje ulije se u pripremljenu porculansku šalicu, te se promatra hoće li se tvar zapaliti u roku od pet minuta.

Ako u šest pokusa ne dođe do zapaljenja, provode se sljedeći pokusi:

Ispitni uzorak od 0,5 ml štrcaljkom se uvodi na pripremljeni filtar papir, te se promatra hoće li se filtar papir zapaliti ili pougljeniti u roku pet minuta nakon dodavanja tekućine. Pokus se provodi tri puta ako prije ne dođe do zapaljenja ili pougljenjivanja.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA PODATAKA

Ispitivanje se može prekinuti čim se u bilo kojem pokusu dođe do pozitivnog rezultata.

2.2. PROCJENA

Ako se tvar zapali u roku pet minuta nakon što je dodana inertnom nosaču i izložena zraku, ili tekuća tvar zapali ili pougljeni filtar papir u roku pet minuta nakon što je dodana i izložena zraku, smatra se pirofornom.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— rezultati pokusa,

— svi dodatni podaci relevantni za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) NF T 20-039 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, NewYork.

▼B

A.14. EKSPLOZIVNA SVOJSTVA

1. METODA

1.1. UVOD

Pomoću ove metode može se odrediti predstavlja li kruta tvar ili tvar u obliku paste opasnost od eksplozije ako se izloži djelovanju plamena (termička osjetljivost), ili udarcu ili trenju (osjetljivost na mehaničke podražaje), te predstavlja li tekuća tvar opasnost ako se izloži djelovanju plamena ili udarca.

Metoda obuhvaća tri elementa:

(a) ispitivanje termičke osjetljivosti (1);

(b) ispitivanje mehaničke osjetljivosti s obzirom na udarac (1);

(c) ispitivanje mehaničke osjetljivosti s obzirom na trenje (1).

Ovom se metodom dolazi do podataka na temelju kojih je moguće procijeniti vjerojatnost izazivanja eksplozije pomoću određenih općenitih podražaja. Metoda nije namijenjena za utvrđivanje može li tvar eksplodirati u bilo kojim uvjetima.

Ova je metoda prikladna da se njome odredi hoće li tvar predstavljati opasnost od eksplozije (termička i mehanička osjetljivost) u uvjetima koji su posebno navedeni u Direktivi. Temelji se na velikom broju uređaja koji su u širokoj upotrebi u mnogim zemljama (1) i koji obično daju smislene rezultate. Priznato je da metoda nije definitivna. Osim navedenih uređaja, dozvoljena je upotreba i alternativnih uređaja pod uvjetom da su međunarodno priznati i da se rezultati mogu dovesti u korelaciju s rezultatima dobivenim navedenim uređajima.

Ispitivanja ne treba provoditi ako se na temelju dostupnih termodinamičkih podataka (npr. toplina nastajanja, toplina raspadanja) i/ili nepostojanja određenih reaktivnih skupina (2) u strukturnoj formuli sa sigurnošću može utvrditi da s nastankom plinova ili oslobađanjem topline tvar nije sposobna za brzo razlaganje (npr. materijal ne predstavlja rizik od eksplozije). Ispitivanje mehaničke osjetljivosti s obzirom na trenje nije potrebno za tekućine.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Eksplozivne tvari:

Tvari koje mogu eksplodirati pod djelovanjem plamena ili koje su osjetljive na udarac ili trenje u navedenom uređaju (ili su mehanički osjetljivije od 1,3-dinitrobenzena u alternativnom uređaju).

1.3. REFERENTNE TVARI

1,3-dinitrobenzen, tehnički kristalizirani proizvod prosijan kroz sito 0,5 mm, za metode ispitivanja osjetljivosti na trenje i na udarac.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, heksogen, ciklonit – CAS 121-82-4), rekristaliziran iz vodenog cikloheksanona, prosijan na mokro kroz sito od 250 μm i zadržan na situ od 150 μm te sušen na 103 ± 2 °C (u trajanju od četiri sata) za drugi niz ispitivanja osjetljivosti na trenje i na udarac.

▼B

1.4. NAČELO METODE

Preliminarni pokusi potrebni su kako bi se uspostavili sigurni uvjeti za provođenje tri pokusa osjetljivosti.

1.4.1. **Pokusi sigurnosnog rukovanja (3)**

Iz sigurnosnih razloga, prije provođenja glavnog pokusa, vrlo mali uzorci (oko 10 mg) tvari izlažu se zagrijavanju bez zatvaranja u plinskom plamenu, udarcima u bilo kojem uređaju prikladnog oblika i trenju pomoću čekića i nakovnja ili kojeg drugog uređaja za trenje. Cilj je utvrditi je li tvar toliko osjetljiva i eksplozivna da propisana ispitivanja osjetljivosti, posebno termičke osjetljivosti, treba provesti uz posebne mjere opreza kako bi se spriječile ozljede.

1.4.2. **Termička osjetljivost**

Metoda obuhvaća zagrijavanje tvari u čeličnoj cijevi koju zatvaraju ploče različitih promjera otvora, kako bi se odredilo ima li tvar tendenciju eksplodiranja pod uvjetima intenzivne topline i definiranog zatvaranja.

1.4.3. **Mehanička osjetljivost (udarac)**

Metoda obuhvaća izlaganje tvari udarcu određene mase koja se baca s određene visine.

1.4.4. **Mehanička osjetljivost (trenje)**

Metoda obuhvaća izlaganje krute tvari ili paste između uobičajenih površina pod određenim uvjetima opterećenja i relativnoga gibanja.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nije navedeno.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Termička osjetljivost (djelovanje plamena)**

1.6.1.1. *Uređaj*

Uređaj se sastoji od čelične cijevi za jednokratnu upotrebu s napravom za zatvaranje za višekratnu upotrebu (Slika 1.), koja je montirana u sigurnosnom uređaju za zagrijavanje. Sve su cijevi od vučenog čeličnog lima (vidjeti Dodatak), imaju unutarnji promjer 24 mm, duljinu 75 mm i debljinu stijenke 0,5 mm. Cijevi su spojene prirubnicama na otvorenom kraju kako bi ih se moglo zatvoriti sklopom mjerne prigušnice. Taj se sklop sastoji od mjerne prigušnice otporne na tlak s otvorom u sredini, učvršćene na cijev pomoću dvodijelnog navojnog spoja (matica i navojna obujmica). Vijak i navojna obujmica izrađeni su od krom-manganovog čelika (vidjeti Dodatak) koji do 800 °C ne iskri. Mjerne prigušnice su ploče debljine 6 mm izrađene od čelika otpornog na toplinu (vidjeti Dodatak), i dostupne su s različitim promjerima otvora.

▼B

1.6.1.2. *Ispitni uvjeti*

Obično se tvar ispituje u obliku u kojem je primljena, ali u nekim slučajevima, npr. ako je prešana, lijevana ili na drugi način sažeta, tvar će prije pokusa možda trebati zdrobiti.

Za krutine, masa materijala koji se koristi u svakom pokusu određuje se suhim postupkom u dvije faze. Tarirana cijev puni se s 9 cm^3 tvari i sabije silom od 80 N kojom se djeluje na ukupni poprečni presjek cijevi. Iz sigurnosnih razloga ili ako bi se fizikalni oblik uzorka sabijanjem mogao promijeniti, mogu se primijeniti druge metode punjenja; npr. ako je tvar jako osjetljiva na trenje, sabijanje nije primjereno. Ako je materijal moguće sažeti, dodaje se još i sabija sve dok se cijev ne napuni do 55 mm od vrha. Odredi se ukupna masa koja se koristi za punjenje cijevi do razine 55 mm, i dodaju se dva dodatna prirasta te se svaki sabije silom od 80 N. Zatim se kod sabijanja, prema potrebi, materijal dodaje, odnosno izuzima kako bi se cijev napunila do razine od 15 mm od vrha. Provodi se drugi po redu suhi postupak, na način da se počne sa sabijenom količinom trećine ukupne mase utvrđene u prvom suhom postupku. Dodaju se još dva dodatna inkremeta uz sabijanje silom od 80 N, a razina u cijevi podešava se na 15 mm od vrha dodavanjem ili oduzimanjem materijala, prema potrebi. Količina krutine utvrđena u drugom suhom postupku koristi se za svaki pokus, s tim da se punjenje obavlja s tri jednake količine, pojedinačno sabijene na 9 cm^3 primjenom za to odgovarajuće sile. (To se može lakše provesti pomoću razdjelnih prstenova).

Cijev se puni tekućinama i gelovima do visine 60 mm s tim da kod gelova treba posebno paziti da se izbjegne stvaranje praznina. Navojna obujmica navuče se na cijev odozdo, umetne se odgovarajuća mjerna prigušnica i nakon što se stavi malo sredstva za podmazivanje na osnovu molibdenovog disulfida, zategne matica. Ključno je provjeriti da se čestice tvari nisu zaglavile između prirubnice i ploče, ili u navojima.

Za zagrijavanje se koristi propan iz boce za industrijsku primjenu koja je opremljena regulatorom tlaka (od 60 do 70 mbara), te se plin preko mjerača jednakomjerno distribuira (što se vizualno opaža promatranjem plamena iz gorača) cjevovodom do četiri gorača. Gorači se nalaze oko ispitne komore kako prikazuje slika 1. Četiri gorača zajedno troše oko 3,2 litre propana u minuti. Mogu se upotrijebiti alternativna plinska goriva i grijači, ali brzina zagrijavanja mora biti kako je navedeno na slici 3. Kod svih uređaja neophodno je provoditi periodičke provjere pomoću cijevi napunjenih dibutil ftalatom kako je prikazano na slici 3.

1.6.1.3. *Provođenje ispitivanja*

Svako se ispitivanje provodi dok cijev ne fragmentira odnosno cijev se zagrijava pet minuta. U pokusu koji rezultira pucanjem cijevi na tri ili više komada koji u nekim slučajevima mogu biti međusobno povezani uskim trakama metala kako je prikazano na slici 2., smatra se da je došlo do eksplozije. Kod pokusa koji rezultiraju pucanjem na manji broj komada ili bez ijednog komada, smatra se da nije bilo eksplozije.

▼B

Prvo se provodi niz od tri testa s mjernom prigušnicom promjera 6,0 mm, pa ako se ne postigne eksplozija, provodi se drugi niz od tri testa s pločom prigušnice promjera 2,0 mm. Ako u bilo kojem od ta dva pokusa dođe do eksplozije, daljnji pokusi nisu potrebni.

1.6.1.4. *Procjena*

Rezultat pokusa smatra se pozitivnim ako do eksplozije dođe u bilo kojem od gornjih nizova pokusa.

1.6.2. **Mehanička osjetljivost (udarac)**

1.6.2.1. *Uređaj (Slika 4.)*

Osnovni dijelovi tipičnog uređaja s padajućim maljem su blok od lijevanog čelika s postoljem, nakovanj, stupac, vodilice, utezi, uređaj za oslobađanje i držač uzorka. Čelični nakovanj 100 mm (promjer) × 70 mm (visina) vijkom je pričvršćen na čelični blok 230 mm (dužina) × 250 mm (širina) × 200 mm (visina) s lijevanim postoljem 450 mm (dužina) × 450 mm (širina) × 60 mm (visina). Stupac, izrađen od bešavne cijevi od vučenog čelika učvršćen je u držaču koji je vijkom pričvršćen na stražnji dio čeličnog bloka. Četiri vijka sidre uređaj na čvrsti betonski blok 60 × 60 × 60 cm na način da su vodilice postavljene potpuno okomito i da uteg pada slobodno. Koriste se utezi od 5 i 10 kg izrađeni od punog čelika. Udarna glava svakog utega izrađena je od otvrdnutog čelika, HRC 60 do 63, i ima minimalno 25 mm u promjeru.

Uzorak koji se ispituje stavi se u uređaj za pokus udarcem, koji se sastoji od dva koaksijalna čvrsta čelična cilindra, jedan iznad drugog, u šupljoj cilindričnoj čeličnoj prstenastoj vodilici. Čvrsti čelični cilindri trebaju biti promjera 10 (– 0,003, – 0,005) mm i visine 10 mm i imati polirane površine, zaobljene rubove (radijus zakrivljenosti 0,5 mm) i tvrdoću od HRC 58 do 65. Šuplji cilindar mora imati vanjski promjer 16 mm, ispolirani provrt 10 (+ 0,005, + 0,010) mm i visinu 13 mm. Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udarac postavlja se na nakovanj (26 mm u promjeru i 26 mm visine) izrađen od čelika i centriran pomoću prstena s perforacijama za istjecanje para.

1.6.2.2. *Ispitni uvjeti*

Volumen uzorka treba biti 40 mm^3, ili volumen koji odgovara alternativnom uređaju. Krute tvari treba ispitati u suhom stanju i pripravljene kako slijedi:

(a) praškaste tvari se prosiju (veličina sita 0,5 mm); za ispitivanje se koristi sve što prolazi kroz sito;

(b) tvari koje su prešane, lijevane ili na drugačiji način sažete, lome se na komadiće i siju; za ispitivanje se koriste prosijani komadići od 0,5 do 1,0 mm u promjeru koji se smatraju reprezentativnim uzorkom izvorne tvari.

Tvari koje se obično isporučuju kao kreme treba ispitati u suhom stanju ako je to moguće ili svakako nakon što se odstrani što je moguće veća količina razrjeđivača. Tekuće tvari ispituju se s razmakom od 1 mm između gornjeg i donjeg čeličnog cilindra.

▼B

1.6.2.3. *Provođenje ispitivanja*

Provodi se niz od šest pokusa bacanjem mase od 10 kg s visine od 0,40 m (40 J). Ako se tijekom tih šest pokusa postigne eksplozija, provodi se drugi niz od šest pokusa, na način da se baca masa od 5 kg s visine od 0,15 m (7,5 J). U drugom uređaju, uzorak se uspoređuje s izabranom referentnom tvari primjenom utvrđenog postupka (npr. tehnikom gore-dolje itd.).

1.6.2.4. *Procjena*

Rezultat pokusa smatra se pozitivnim ako do eksplozije (pojava plamena i/ili praska ekvivalentna je eksploziji) dođe najmanje jednom u bilo kojem od pokusa kod navedenog uređaja za ispitivanje osjetljivosti na udarac ili ako je uzorak osjetljiviji od 1,3-dinitrobenzen ili RDX u alternativnom ispitivanju osjetljivosti na udarac.

1.6.3. **Mehanička osjetljivost (trenje)**

1.6.3.1. *Uređaj (Slika 5.)*

Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na trenje sastoji se od temeljne ploče od lijevanog čelika na koju je postavljena naprava za trenje. Ona se sastoji od fiksnog porculanskog klina/štipaljke i pokretne porculanske ploče. Porculanska ploča nalazi se u klizaču koji se kreće unutar dvije vodilice. Klizač je spojen na elektromotor preko ojnice, ekscentra i odgovarajućeg zupčastog prijenosa na način da se porculanska ploča pomakne natrag i naprijed ispod porculanskog klina samo jednom na udaljenosti od 10 mm. Porculanski klin može se opteretiti silom od, primjerice, 120 ili 360 N.

Ravne porculanske ploče izrađene su od bijelog tehničkog porculana (hrapavost 9 do 32 μm), veličine 25 mm (dužina) × 25 mm (širina) × 5 mm (visina). Cilindrični porculanski klin također je izrađen od bijelog tehničkog porculana, dugačak je 15 mm, ima promjer 10 mm i grube površine sfernih rubova promjera zaobljenosti 10 mm.

1.6.3.2. *Ispitni uvjeti*

Volumen uzorka treba biti 10 mm^3 ili volumen koji odgovara alternativnom uređaju.

Krute tvari ispituju se u suhom stanju i pripravljene kako slijedi:

(a) praškaste tvari prosiju se (veličina sita 0,5 mm); za ispitivanje se koristi sve što prođe kroz sito;

(b) tvari koje su prešane, lijevane ili na drugačiji način sažete, lome se na komadiće i siju; za ispitivanje se koriste prosijani komadići < 0,5 mm u promjeru.

Tvari koje se obično isporučuju kao paste treba ispitati u suhom stanju ako je to moguće. Ako tvar nije moguće pripraviti u suhom stanju, pasta (nakon što se odstrani što je moguće veća količina razrjeđivača) se ispituje kao 0,5 mm debeli, 2 mm širok, 10 mm dugačak film koji se pripravlja pomoću šablone.

▼B

1.6.3.3. *Provođenje ispitivanja*

Porculanski klin postavlja se na uzorak koji se ispituje, i optereti se. Kod provođenja pokusa, oznake nanesene spužvom na porculansku ploču moraju ležati transverzalno u odnosu na smjer kretanja. Treba paziti da se klin nalazi na uzorku, da ispod klina ima dovoljno materijala koji se ispituje kao i da se ploča ispod klina pomiče propisno. Paste se nanašaju na ploču pomoću 0,5 mm debele šablone s urezom veličine 2 × 10 mm. Porculanska ploča mora se pomaknuti 10 mm naprijed i natrag ispod porculanskog klina u vremenu od 0,44 sekunde. Svaki dio površine ploče i klina smije se koristiti samo jednom; dva kraja svakog klina služe za dva pokusa, a svaka od dvije površine ploče služi za tri pokusa.

Niz od šest pokusa provodi se pod opterećenjem od 360 N. Ako tijekom tih šest pokusa dođe do pozitivnog događaja, provodi se još jedan niz od šest pokusa s opterećenjem od 120 N. U drugom uređaju, uzorak se uspoređuje s odabranom referentnom tvari primjenom utvrđenog postupka (npr. tehnika gore-dolje itd.).

1.6.3.4. *Procjena*

Rezultat pokusa smatra se pozitivnim ako do eksplozije (pucketanje i/ili prasak ili pojava plamena ekvivalentni su eksploziji) dođe najmanje jednom u bilo kojem pokusu kod navedenog uređaja za ispitivanje trenja ili ako su zadovoljeni ekvivalentni kriteriji u alternativnom ispitivanju osjetljivosti na trenje.

2. **PODACI**

U načelu smatra se da tvar predstavlja opasnost od eksplozije u smislu Direktive ako je ispitivanje termičke osjetljivosti, osjetljivosti na udarac ili trenje dalo pozitivan rezultat.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE OISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— identitet, sastav, čistoća, sadržaj vlage itd. ispitivane tvari,

— fizikalni oblik uzorka i je li uzorak bio drobljen, lomljen i/ili prosijavan ili ne,

— zapažanja tijekom ispitivanja termičke osjetljivosti (npr. masa uzorka, broj komadića itd.),

— zapažanja tijekom ispitivanja mehaničke osjetljivosti (npr. nastajanje znatnih količina dima ili potpuna razgradnja bez praska, plamena, iskri, praska, pucketanja itd.),

— rezultate svakog tipa ispitivanja,

— ako je korišten alternativni uređaj, treba pružiti znanstveno opravdanje za to kao i dokaz o korelaciji između rezultata dobivenih navedenim uređajem i rezultata dobivenih ekvivalentnim uređajem,

▼B

— sve korisne napomene kao što su upute na pokuse sa sličnim proizvodima koje bi mogle biti relevantne za pravilno tumačenje rezultata,

— sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

3.2. TUMAČENJE I PROCJENA REZULTATA

U izvješću o ispitivanju treba navesti sve rezultate koji se smatraju lažnim, neuobičajenim, ili nereprezentativnim. Ako bilo koji od rezultata ne bi trebalo uzeti u obzir, za to treba dati objašnjenje i navesti rezultate eventualnog alternativnog ili dodatnog ispitivanja. Ako se neuobičajeni rezultat ne može objasniti, mora se prihvatiti takav kakav jest i primijeniti za klasifikaciju tvari s tim u skladu.

4. **REFERENCE**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750 -60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (September 85) Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Dodatak

Primjer specifikacije materijala za ispitivanje termičke osjetljivosti (vidjeti normu DIN 1623)

(1) Cijev: Specifikacija materijala br. 1.0336.505 g

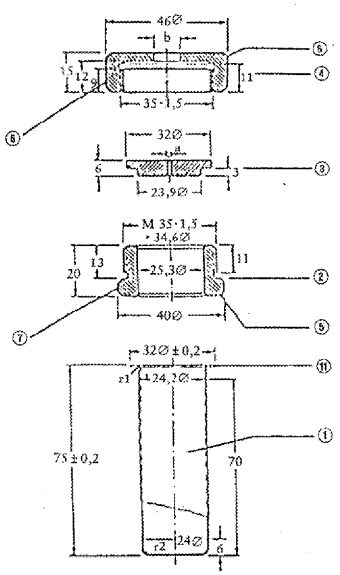
(2) Mjerna prigušnica: Specifikacija materijala br. 1.4873

(3) Navojna obujmica i matica: Specifikacija materijala br. 1.3817

Slika 1.

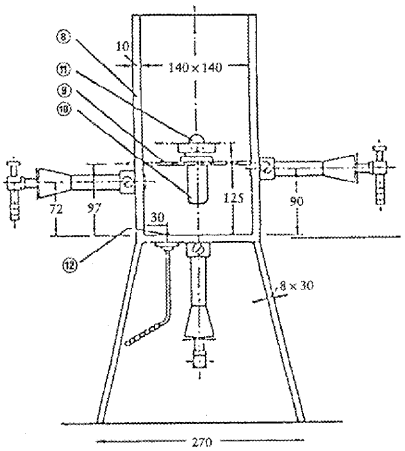
Uređaj za ispitivanje termičke osjetljivosti

(sve dimenzije izražene su u milimetrima)



Slika 1.a Čelična cijev i pribor

(1) cijev
(1a) vanjska prirubnica
(2) navojna obujmica; navoj s malim trenjem
(3) mjerna prigušnica a = 2,0 ili 6,0 mm u promjeru
(4) matica b = 10 mm u promjeru
(5) površina sa žlijebovima
(6) 2 ravne površine za natezač veličine 41



Slika 1.b Sigurnosni uređaj za zagrijavanje

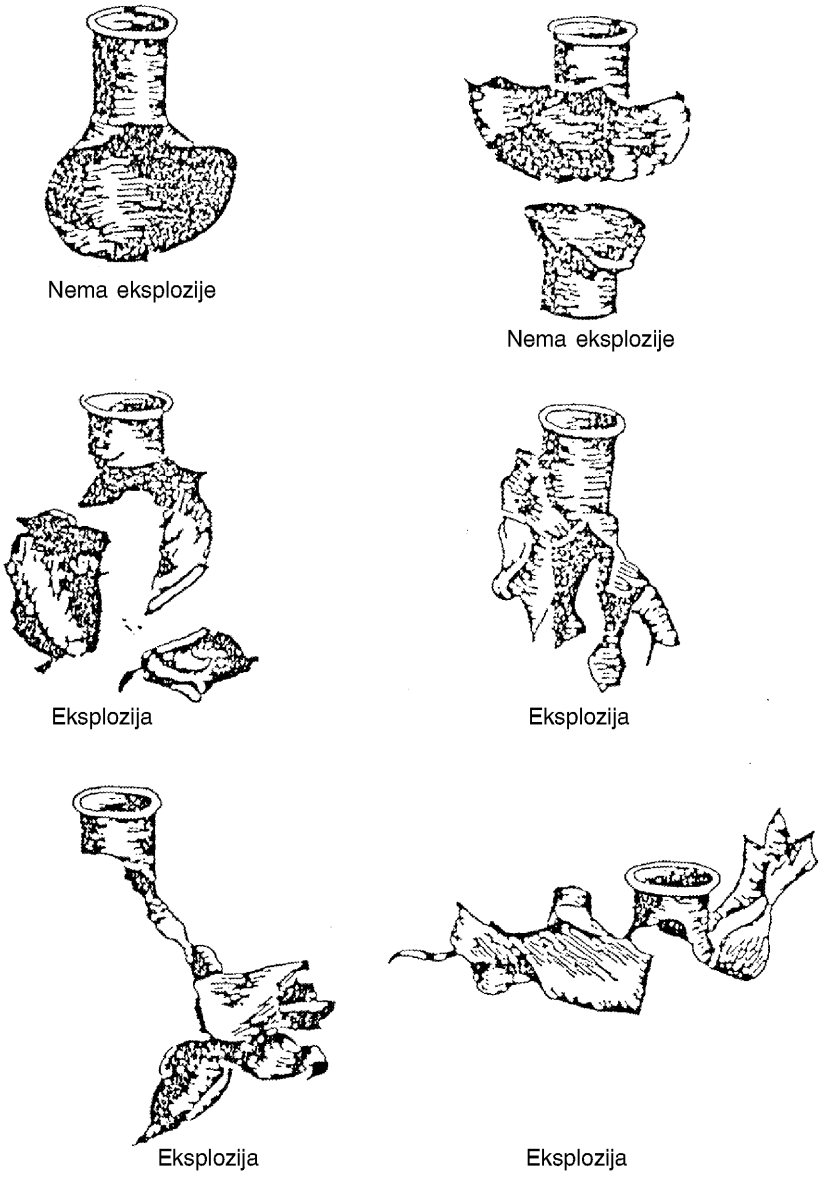
(7) 2 ravne površine za natezač veličine 36
(8) kućište otporno na krhotine
(9) 2 potporne šipke za cijev
(10) montirana cijev
(11) položaj za stražnji gorač; ostali gorači se vide
(12) mlaznica

▼B

Slika 2.

Ispitivanje termičke osjetljivosti

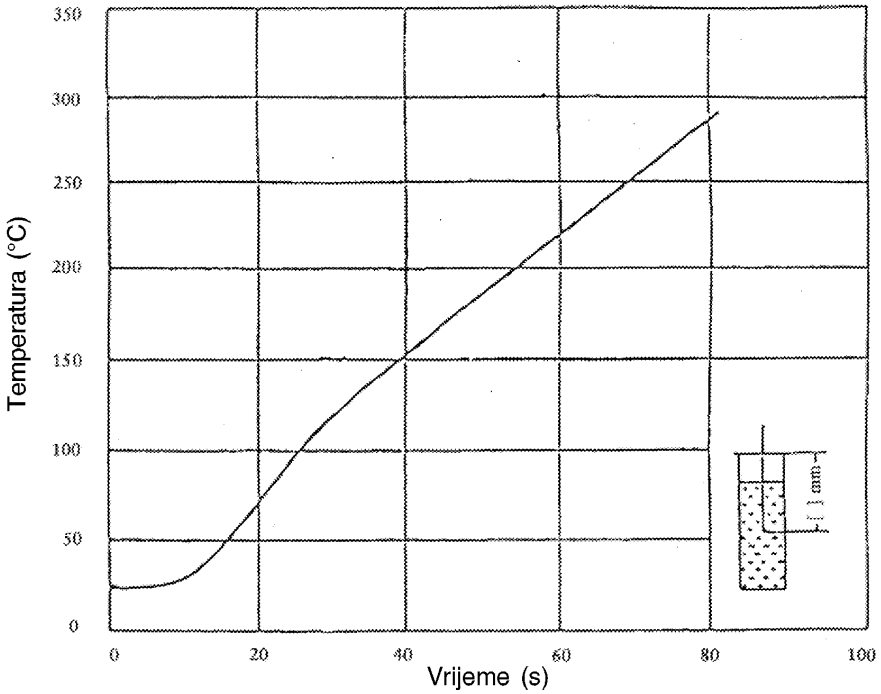
(primjer fragmentacije)



▼B

Slika 3.

Kalibracija brzine zagrijavanja za ispitivanje termičke osjetljivosti



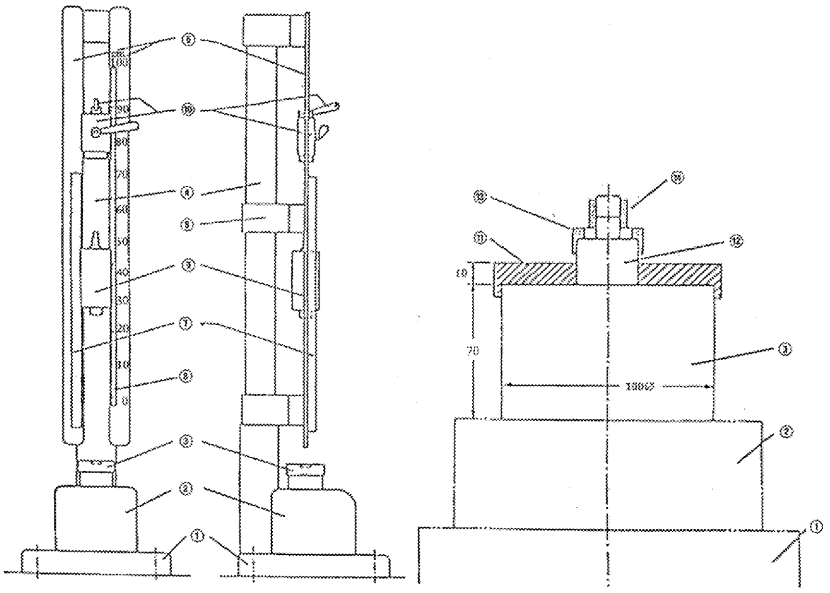
Krivulja temperature u odnosu na vrijeme koja se dobije zagrijavanjem dibutil ftalata (27 cm^3) u zatvorenoj (mjerna prigušnica s otvorom 1,5 mm) cijevi kod brzine protoka propana od 3,2 litre/minuti. Temperatura se mjeri termoparom od kromela/alumela u omotaču od nehrđajućeg čelika promjera 1 mm, postavljenim u središte 43 mm ispod ruba cijevi. Brzina zagrijavanja između 135 °C i 285 °C treba biti između 185 i 215 K/minuti.

▼B

Slika 4.

Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udarac

(sve dimenzije izražene su u milimetrima)



Slika 4.a Padajući malj, prednja i bočna strana, općenito

(1) temeljna ploča, 450 × 450 × 60
(2) čelični blok, 230 × 230 × 200
(3) nakovanj, ø 100 × 70
(4) kolona
(5) srednji poprečni članak
(6) 2 vodilice
(7) nazubljeno polužje

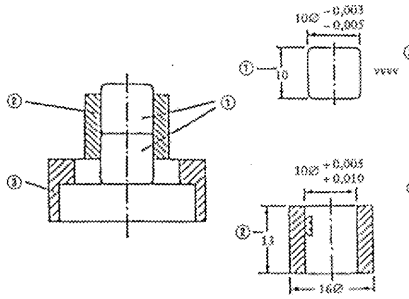
Slika 4.b Padajući malj, donji dio

(8) stupnjevana vaga
(9) padajući malj (masa koja pada)
(10) element za držanje i otpuštanje
(11) ploča za postavljanje u položaj
(12) među-nakovanj (zamjenljivi) ø 26 × 26
(13) prsten s otvorima
(14) udarni element

▼B

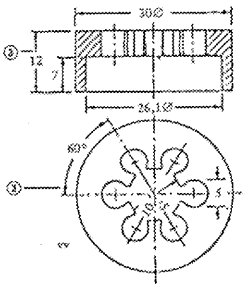
Slika 4.

Nastavak s prethodne stranice

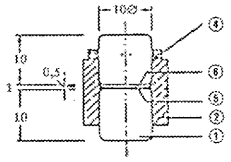


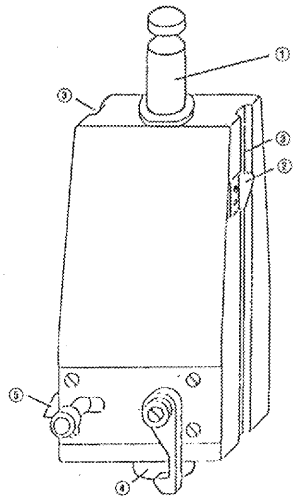
Slika 4.c Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udarac za praškaste tvari ili paste

(1) čelični cilindri
(2) prstenasta vodilica za čelične cilindre
(3) prsten s otvorima za postavljanje u položaj
  (a) vertikalni presjek
  (b) tlocrt
(4) gumeni prsten
(5) tekuća tvar (40 mm^3)
(6) prostor bez tekućine



Slika 4.d Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udarac za tekuće tvari





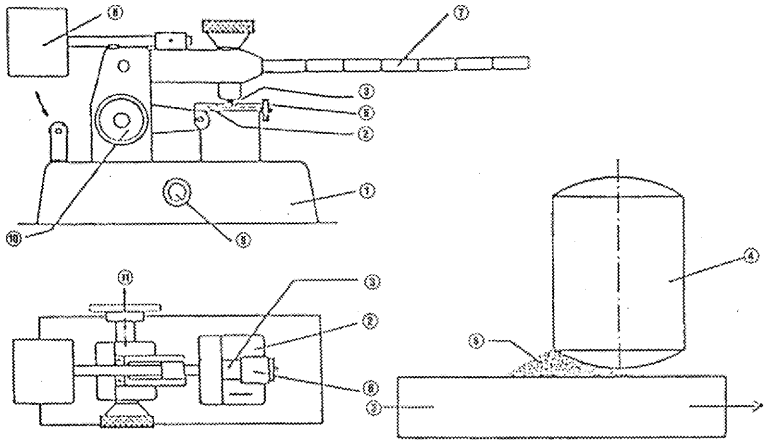
Slika 4.e Malj (masa koja pada težine 5 kg)

(1) ovjes
(2) označivač visine
(3) utor za pozicioniranje
(4) cilindrična udarna glava
(5) odbojnik

▼B

Slika 5.

Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na trenje



Slika 5.a Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na trenje; nacrt i tlocrt

(1) čelično postolje
(2) pomični klizač
(3) porculanska ploča, 25 × 25 × 5 mm, koju drži klizač
(4) fiksni porculanski klin, ø 10 × 15 mm
(5) uzorak koji se ispituje, približno 10 mm^3)

Slika 5.b Početni položaj klina na uzorku

(6) držač klina
(7) ručka za punjenje
(8) protuuteg
(9) sklopka
(10) kolo za postavljanje klizača u početni položaj
(11) smjer prema elektromotornom pogonu

▼B

A.15. **TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA (TEKUĆINE I PLINOVI)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Eksplozivne tvari i tvari koje se spontano zapale u dodiru sa zrakom na sobnoj temperaturi ne treba podvrgavati ovom ispitivanju. Ispitni postupak primjenljiv je na plinove, tekućine i pare koje je u prisutnosti zraka moguće upaliti vrućom površinom.

Temperatura samozapaljenja može se znatno smanjiti prisustvom katalitičkih nečistoća, površinskim materijalom ili većim volumenom ispitne posude.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Stupanj samozapaljenja izražava se temperaturom samozapaljenja. Temperatura samozapaljenja je najniža temperatura na kojoj će se ispitivana tvar zapaliti ako se pomiješa sa zrakom u uvjetima utvrđenim u ovoj ispitnoj metodi.

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari navedene su u normama (vidjeti 1.6.3.) One prvenstveno služe za povremenu provjeru primijenjene metode te radi usporedbe s rezultatima dobivenim drugim metodama.

1.4. NAČELO METODE

Ovom se metodom određuje minimalna temperatura unutarnje površine kućišta koja će rezultirati zapaljenjem plina, pare ili tekućine ubrizgane u to kućište.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Ponovljivost varira u skladu s područjem temperatura samozapaljenja i primijenjene ispitne metode.

Osjetljivost i specifičnost ovise o primijenjenoj ispitnoj metodi.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Uređaj**

Uređaj je opisan u metodi koja se spominje u 1.6.3.

1.6.2. **Ispitni uvjeti**

Uzorak ispitivane tvari ispituje se u skladu s metodom navedenom u 1.6.3.

1.6.3. **Provođenje ispitivanja**

Vidjeti norme IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **PODACI**

Bilježi se temperatura ispitivanja, atmosferski tlak, količina uzorka koja se koristi i vremenski pomak do pojave zapaljenja.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće podatke:

— precizna specifikacija tvari (identitet i nečistoće),

— količina uzorka koja se koristi, atmosferski tlak,

— uređaj koji se koristi,

— rezultati mjerenja (temperature ispitivanja, rezultati u vezi zapaljenja, odgovarajući vremenski razmaci),

— svi dodatni podaci relevantni za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

Nema ih.

▼B

A.16. **RELATIVNA TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA ZA KRUTINE**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Eksplozivne tvari i tvari koje se spontano zapale u dodiru sa zrakom na temperaturi okoline ne treba podvrgavati ovom ispitivanju.

Ovo se ispitivanje provodi sa svrhom dobivanja preliminarnih podataka o samozapaljivosti krutih tvari na povišenim temperaturama.

Ako se toplina koja se razvija bilo reakcijom tvari s kisikom ili egzotermičnim raspadanjem ne gubi dovoljno brzo u okolini, dolazi do samozagrijavanja koje vodi do samozapaljenja. Dakle, do samozapaljenja dolazi kad brzina kojom se toplina razvija premaši brzinu gubitka topline.

Ovaj je ispitni postupak koristan kao preliminarni test probira za krute tvari. Radi složene naravi zapaljenja i izgaranja krutina, temperaturu samozapaljenja koja se odredi prema ovoj ispitnoj metodi treba koristiti samo u svrhe uspoređivanja.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Temperatura samozapaljenja koja se dobije ovom metodom minimalna je temperatura okoline izražena u °C na kojoj će se u određenim uvjetima zapaliti određeni volumen tvari.

1.3. REFERENTNA TVAR

Nema je.

1.4. NAČELO METODE

Izvjestan volumen tvari koja se ispituje stavi se u peć na temperaturu okoline; bilježi se krivulja temperature u funkciji vremena s obzirom na uvjete u središtu uzorka dok se temperatura peći povećava brzinom od 0,5 °C/min do 400 °C, ili do tališta ako je ono na nižoj temperaturi. U svrhu ovog ispitivanja, temperatura peći u kojoj temperatura uzorka koji se samozagrijava dostiže 400 °C naziva se temperaturom samozapaljenja.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Uređaj**

1.6.1.1. *Peć*

Laboratorijska peć (zapremnine oko 2 litre) s ugrađenom regulacijom temperature, prirodnom cirkulacijom zraka i sustavom za rastereće-nje. Kako bi se izbjegao eventualan rizik od eksplozije, plinovi koji nastaju razlaganjem ne smiju doći u dodir s električnim grijaćim elementima.

▼B

1.6.1.2. *Kocka od žičane mrežice*

Komad mrežice otvora 0,045 mm izrađene od nehrđajuće čelične žice treba izrezati prema modelu u slici 1. Mrežicu treba složiti savijanjem i pričvrstiti žicom da se dobije kocka s otvorenim gornjim dijelom.

1.6.1.3. *Termoparovi*

Odgovarajući termoparovi.

1.6.1.4. *Zapisivač*

Bilo koji dvokanalni zapisivač kalibriran za temperaturu od 0 do 600 °C ili za odgovarajući napon.

1.6.2. **Ispitni uvjeti**

Tvari se ispituju kako su primljene.

1.6.3. **Provođenje ispitivanja**

U kocku se stavi tvar koja će se ispitivati, lagano se potapka i dodaje još tvari sve dok kocka nije potpuno puna. Kocka se tada objesi u središtu peći na sobnoj temperaturi. Jedan termopar se postavi u središte kocke, a drugi između kocke i stijenke peći na kojoj se mjeri temperatura peći.

Temperature peći i uzorka mjere se cijelo vrijeme dok se temperatura peći povećava brzinom od 0,5 °C/min do 400 °C ili do tališta ako je ono na nižoj temperaturi.

Kad tvar zapali uzorak, termopar će pokazati nagli porast temperature iznad temperature peći.

2. **PODACI**

Za procjenu je relevantna temperatura peći na kojoj uzorak samozagrijavanjem dostiže temperaturu od 400 °C (vidjeti sliku 2.).

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— opis tvari koja se ispituje,

— rezultati mjerenja uključujući krivulju temperatura/vrijeme,

— svi podaci relevantni za tumačenje rezultata.

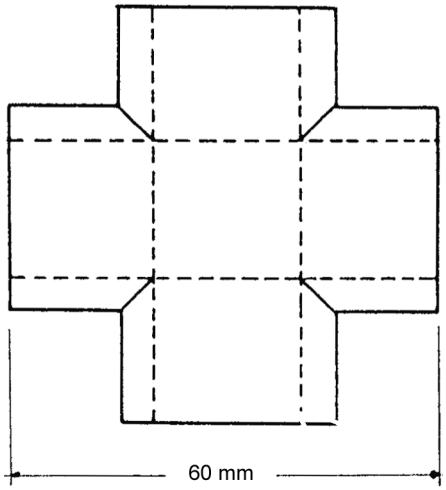
4. **REFERENCE**

NF T 20-036 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

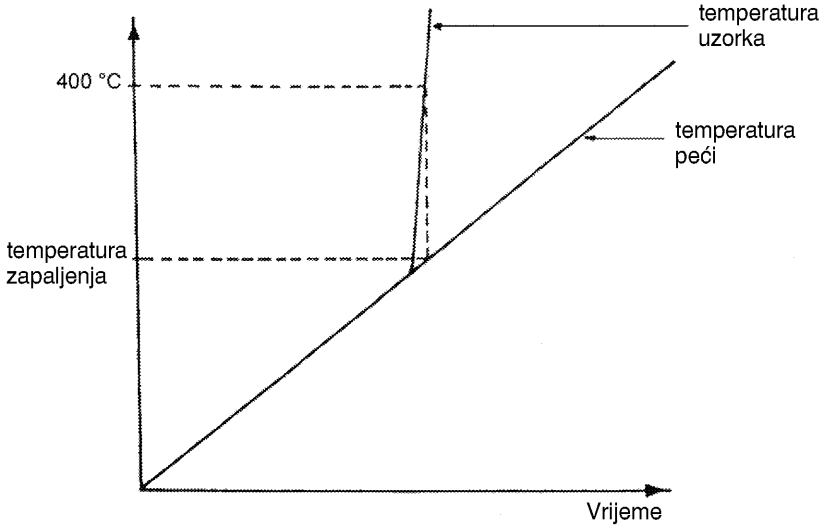
Slika 1.

Model 20 milimetarske ispitne kocke



Slika 2.

Tipična krivulja temperatura/vrijeme



▼B

A.17. **SVOJSTVA OKSIDACIJE (KRUTINE)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Prije provođenja ovog ispitivanja korisno je raspolagati preliminarnim informacijama o eventualno eksplozivnim svojstvima tvari.

Ovo ispitivanje nije primjenljivo na tekućine, plinove, eksplozivne ili lako zapaljive tvari, ili perokside.

Ovo ispitivanje ne treba provoditi ako je provjerom strukturne formule sa sigurnošću utvrđeno da tvar nije u stanju egzotermički reagirati sa zapaljivim materijalom.

Kako bi se utvrdilo treba li ispitivanje provesti uz posebne mjere opreza, provodi se preliminarni pokus.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Vrijeme gorenja: vrijeme reakcije, u sekundama, uzeto iz zone reakcije potrebno za prolaz kroz hrpicu materijala, prema postupku opisanom u 1.6.

Brzina gorenja: izražena u milimetrima po sekundi.

Maksimalna brzina gorenja: najveća vrijednost brzine gorenja dobivena s mješavinama koje sadrže 10 do 90 % težinskog udjela oksidansa.

1.3. REFERENTNA TVAR

Barijev nitrat (analitičke kvalitete) koristi se kao referentna tvar za ispitivanje i za preliminarni test.

Referentna mješavina je mješavina barijevog nitrata s celulozom u prahu, pripravljena u skladu s 1.6., koja ima maksimalnu brzinu gorenja (obično mješavina koja sadrži 60 % težinskog udjela barijevog nitrata).

1.4. NAČELO METODE

Preliminarni test provodi se radi sigurnosti. Ako je preliminarnim testom jasno pokazano da ispitivana tvar ima svojstva oksidacije, daljnja ispitivanja nisu potrebna. Ako to nije slučaj, tvar zatim treba u potpunosti ispitati.

Kod punog ispitivanja, tvar koja se ispituje miješa se u raznim omjerima s određenom zapaljivom tvari. Od svake se mješavine napravi hrpica koja se s jednog kraja zapali. Maksimalna brzina gorenja koja se odredi uspoređuje se s maksimalnom brzinom gorenja referentne mješavine.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Prema potrebi, svaka metoda mljevenja i miješanja je valjana pod uvjetom da se najveća brzina gorenja u šest odvojenih testova ne razlikuje od aritmetičke srednje vrijednosti za više od 10 %.

▼B

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Priprema**

1.6.1.1. *Ispitivana tvar*

Smanjiti ispitni uzorak na veličinu čestica < 0,125 mm primjenjujući sljedeći postupak: prosijati ispitnu tvar, samljeti preostali dio, ponoviti postupak sve dok cijela količina ispitnog uzorka ne prođe kroz sito.

Smije se koristiti bilo koja tehnika mljevenja i prosijavanja koja zadovoljava kriterije kvalitete.

Prije pripreme mješavine, tvar se suši na 105 °C sve dok se ne postigne stalna težina. Ako je temperatura razlaganja tvari koja se ispituje ispod 105 °C, tvar treba sušiti na odgovarajućoj nižoj temperaturi.

1.6.1.2. *Zapaljiva tvar*

Kao zapaljiva tvar koristi se celuloza u prahu. Celuloza mora biti one vrste koja se koristi za kromatografiju u tankom sloju ili kromatografiju u koloni. Za vrstu koja sadrži više od 85 % vlakana u dužinama između 0,020 i 0,075 mm dokazano je da je odgovarajuća. Celuloza u prahu propušta se kroz sito veličine mrežice 0,125 mm. Istu partiju celuloze treba koristiti cijelo vrijeme ispitivanja.

Prije pripreme mješavine, celuloza u prahu suši se na 105 °C sve dok se ne postigne stalna težina.

Ako se u preliminarnom testu koristi piljevina, treba je pripraviti od drveta četinjača skupljanjem dijela koji je prošao kroz sito mrežice 1,6 mm, dobro promiješati, te zatim sušiti na 105 °C tijekom četiri sata u sloju debljine do 25 mm. Ohladiti i do upotrebe, po mogućnosti unutar 24 sata od sušenja, skladištiti u hermetički zatvorenom spremniku koji se puni do mjere koliko je to praktično.

1.6.1.3. *Izvor paljenja*

Kao izvor paljenja treba koristiti vrući plamen iz plinskoga gorača (minimalnog promjera 5 mm). Ako se koristi neki drugi izvor paljenja (npr. kod ispitivanja u inertnoj atmosferi), taj izvor u izvješću treba opisati i dati obrazloženje upotrebe takvog izvora.

1.6.2. **Provođenje ispitivanja**

Napomena:

Mješavine oksidansa s celulozom ili piljevinom smatraju se potencijalno eksplozivnim te njima treba oprezno rukovati.

1.6.2.1. *Preliminarni test*

Osušena tvar dobro se izmiješa s osušenom celulozom ili piljevinom u omjerima 2 težinska udjela ispitivane tvari u odnosu na 1 težinski dio celuloze ili piljevine, te se oblikuje u malu konusnu hrpicu dimenzija 3,5 cm (promjer osnovice) × 2,5 cm (visina) rahlim punjenjem šablone konusnog oblika (npr. laboratorijski stakleni lijevak sa začepljenim otvorom).

▼B

Hrpica se postavi na hladnu, nezapaljivu, neporoznu podlogu slabe toplinske provodljivosti. Pokus treba provoditi u digestoru kako je opisano u 1.6.2.2.

Izvor zapaljenja dovede se u dodir s konusnom hrpicom. Promatraju se i bilježe jačina i trajanje rezultirajuće reakcije.

Ako je reakcija snažna, tvar treba smatrati oksidirajućom.

U svakom slučaju u kojem postoji sumnja potrebno je provesti cijeli postupak ispitivanja kako se opisuje dalje u tekstu.

1.6.2.2. *Potpuno ispitivanje*

Pripraviti mješavine oksidansa i celuloze s težinskim udjelima od 10 do 90 % oksidansa u 10 %-tnim prirastima. Kod graničnih slučajeva treba upotrijebiti gotove mješavine oksidansa i celuloze kako bi se maksimalna brzina gorenja dobila točnije.

Hrpica se oblikuje pomoću kalupa. Kalup je izrađen od metala, duljine je 250 mm i trokutastog poprečnog presjeka unutarnje visine 10 mm i unutarnje širine 20 mm. S obje strane kalupa, u uzdužnom smjeru, postavljene su dvije metalne ploče kao bočni graničnici koji se protežu 2 mm preko gornjega ruba trokutastog poprečnog presjeka (slika). Taj se sklop bez sabijanja puni mješavinom u nešto prekomjernoj količini. Nakon što se kalup spusti s visine od 2 cm na krutu površinu, preostala prekomjerna količina tvari poravna se tupim limom. Bočni graničnici se skinu, a preostali se prah zagladi valjkom. Na vrh kalupa stavi se nezapaljiva, neporozna podloga slabe toplinske provodljivosti, uređaj se preokrene i kalup ukloni.

Hrpicu treba postaviti u smjeru strujanja zraka u digestoru.

Brzina zraka treba biti dostatna da spriječi istjecanje para u laboratorij i ne smije varirati tijekom testa. Strujanjem zraka oko uređaja mora se formirati zračna zavjesa.

Uslijed higroskopičnosti celuloze i nekih tvari koje se ispituju, ispitivanje treba provesti što je moguće brže.

Zapaliti jedan kraj hrpice na način da ga se dotakne plamenom.

Mjeriti vrijeme reakcije u duljini od 200 mm nakon što se područje reakcije proširilo preko početne udaljenosti od 30 mm.

Ispitivanje se provodi s referentnom tvari i najmanje jednom sa svakom mješavinom iz područja mješavina ispitivane tvari s celulozom.

Ako se utvrdi da je maksimalna brzina gorenja znatno veća od brzine referentne mješavine, ispitivanje treba zaustaviti; u suprotnom, pokus treba ponavljati pet puta za svaku od tri mješavine koje daju najveću brzinu gorenja.

▼B

Ako se sumnja da bi rezultat mogao biti lažno pozitivan, pokus treba ponoviti s tim da se umjesto celuloze upotrijebi inertna tvar slične dimenzije čestica, kao što je dijatomejska zemlja. Alternativno, celuloznu mješavinu ispitivane tvari koja ima najveću brzinu gorenja treba ponovno ispitati u inertnoj atmosferi (< 2 % v/v udjela sadržaja kisika).

2. **PODACI**

Iz sigurnosnih razloga, karakterističnim oksidativnim svojstvom tvari koja se ispituje smatra se maksimalna brzina gorenja – a ne srednja vrijednost.

Za procjenu relevantna je najviša vrijednost brzine gorenja određene mješavine u nizu u šest pokusa.

Iscrtati krivulju najviše vrijednosti brzine gorenja za svaku mješavinu u odnosu na koncentraciju oksidansa. S krivulje očitati maksimalnu brzinu gorenja.

Šest izmjerenih vrijednosti u jednom nizu dobivenih od mješavine kod maksimalne brzine gorenja ne smiju se razlikovati od aritmetičke srednje vrijednosti za više od 10 %; u protivnom, treba primijeniti bolje metode mljevenja i miješanja.

Usporediti maksimalnu brzinu gorenja koja je postignuta s maksimalnom brzinom gorenja referentne mješavine (vidjeti 1.3.).

Ako se ispitivanja provode u inertnoj atmosferi, maksimalna brzina reakcije uspoređuje se s maksimalnom brzinom reakcije referentne mješavine u inertnoj atmosferi.

3. **IZVJEŠĆE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— identitet, sastav, čistoća, sadržaj vlage itd. ispitivane tvari,

— eventualna obrada ispitivanog uzorka (npr. mljevenje, sušenje),

— izvor zapaljenja koji je upotrebljen u ispitivanju,

— način reakcije (npr. gorenje uz bljesak na površini, gorenje kroz cijelu masu, sve informacije o zapaljivim proizvodima itd.),

— sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata, uključujući opis jačine (plamen, iskre, dimne pare, polagano tinjanje itd.) i približno trajanje tijekom preliminarnog sigurnosnog testa/testa probira i za ispitivanu tvar i za referentnu tvar,

— rezultati pokusa s inertnom tvari, ako su provedeni,

— rezultati pokusa u inertnoj atmosferi, ako su provedeni.

▼B

3.2. TUMAČENJE REZULTATA.

Tvar treba smatrati oksidirajućom tvari ako:

(a) u preliminarnom pokusu dođe do snažne reakcije;

(b) je u punom ispitivanju maksimalna brzina gorenja mješavina veća ili jednaka maksimalnoj brzini gorenja referentne mješavine celuloze i barijevog nitrata.

Kako bi se izbjegao lažni pozitivni rezultat, kod tumačenja rezultata treba uzeti u obzir i rezultate ispitivanja tvari pomiješane s inertnim materijalom i/ili ispitivanja u inertnoj atmosferi.

4. **REFERENCE**

NF T 20-035 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the oxidising properties of solids.

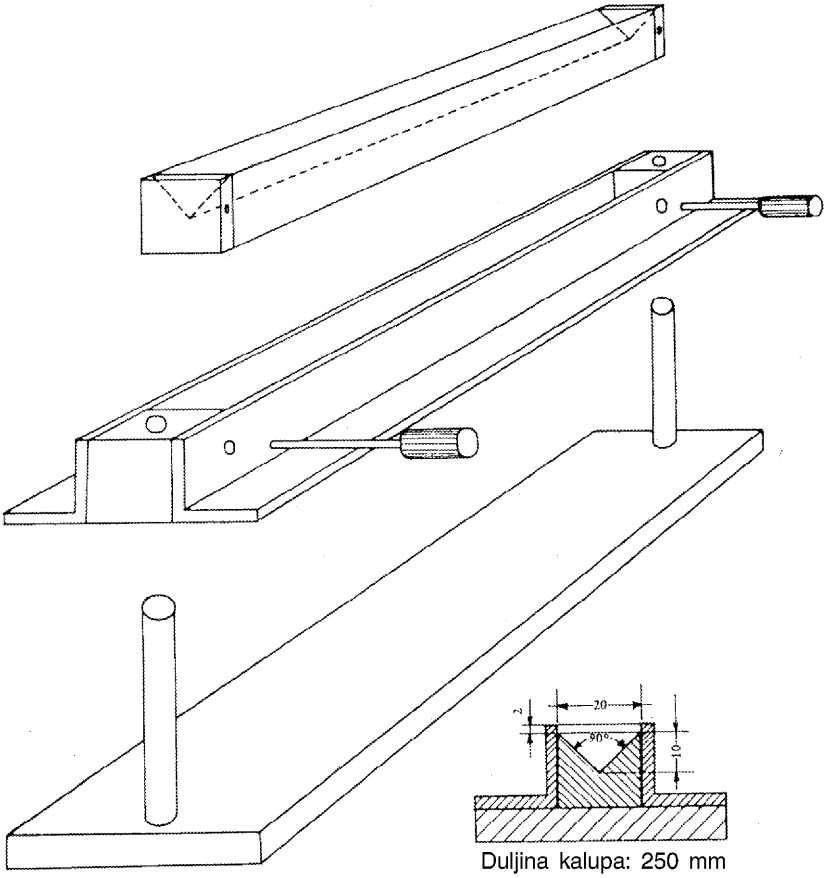
▼B

Dodatak

Slika

Kalup i pribor za pripravu hrpice

(Sve dimenzije izražene su u milimetrima)



Duljina kalupa: 250 mm
Materijal: aluminij

▼B

A.18. **OPĆI PROSJEK MOLEKULSKE TEŽINE I RASPODJELA MOLEKULSKE TEŽINE POLIMERA**

1. **METODA**

Metoda kromatografije na permeabilnom gelu preslika je OECD-ove Smjernice za ispitivanje TG 118 (1996.). Temeljna načela i daljnje tehničke informacije navedene su u referenci (1).

1.1. UVOD

Kako su svojstva polimera vrlo raznolika, nemoguće je opisati jednu metodu kojom se precizno utvrđuju uvjeti separacije i procjene koji obuhvaćaju sve slučajnosti i posebnosti do kojih dolazi kod separacije polimera. Posebno, složeni sustavi polimera često nisu pogodni za kromatografiju na permeabilnom gelu (GPC). Kad kromatografija GPC nije u praksi provediva, molekulske mase moguće je određivati drugim metodama (vidjeti Dodatak). U takvim slučajevima treba potanko obrazložiti zašto se koristi baš određena metoda.

Opisana metoda temelji se na normi DIN 55672 (1). Ta DIN norma sadrži iscrpne informacije o načinu na koji treba provoditi pokuse i procjenjivati podatke. Ako su izmjene uvjeta pokusa nužne, takve je promjene potrebno opravdati. Dozvoljeno je koristiti druge norme ako se za njih u potpunosti navedu reference. U opisanoj metodi, za kalibraciju se koriste uzorci polistirena poznate polidisperzivnosti, i možda će je za određene polimere, npr. polimere dugih razgranatih lanaca i topljive u vodi, biti potrebno prilagoditi.

1.2. DEFINICIJE I MJERNE JEDINICE

Opći prosjek molekulske težine M_n i prosječna molekulska težina M_w određuju se sljedećim jednadžbama:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

gdje je:

H_i razina detektorskog signala od osnovice za volumen retencije V_i

M_i molekulska težina frakcije polimera kod volumena retencije V_i i

n broj točaka s podacima

Širina raspodjele molekulske težine, kojom se mjeri disperzivnost sustava, određena je omjerom M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENTNE TVARI

Kako je kromatografija GPC relativna metoda, neophodno je provesti kalibraciju. Za to se obično koriste etaloni za usko raspodijeljene, linearno strukturirane polistirene poznatih prosječnih molekulskih težina M_n i M_w, te poznate raspodjele molekulske težine. Kalibracijska krivulja može se koristiti za određivanje molekulske težine nepoznatog uzorka samo ako su uvjeti za separaciju uzorka i etaloni odabrani na istovjetan način.

Utvrđena veza između molekulske težine i volumena eluiranja vrijedi jedino pod konkretnim uvjetima svakog pojedinog pokusa. Ti uvjeti uključuju prije svega temperaturu, otapalo (ili mješavinu otapala), uvjete kromatografije i separacijsku kolonu ili sustav kolona.

Na taj način određene molekulske težine uzorka relativne su vrijednosti i opisujemo ih kao „ekvivalentne molekulske težine polistirena”. To znači da u zavisnosti o strukturnim i kemijskim razlikama između uzorka i etalona, molekulska težina može više ili manje odstupati od apsolutnih vrijednosti. Ako se koriste drugi etaloni, npr. polietilen glikol, polietilen oksid, polimetil metakrilat, poliakrilna kiselina, razlog za to treba navesti.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

GPC kromatografijom moguće je odrediti kako raspodjelu molekulske težine uzorka tako i prosječne molekulske težine (M_n, M_w). GPC metoda je poseban tip tekućinske kromatografije kod kojeg se uzorak separira prema hidrodinamičkim volumenima pojedinih komponenata (2).

Do separacije dolazi prolazom uzorka kroz kolonu koja je ispunjena propusnim materijalom, obično organskim gelom. Male molekule mogu penetrirati kroz pore dok se velike molekule isključuju. Dakle, put velikih molekula je kraći i one prve eluiraju. Molekule srednje veličine prolaze kroz neke od pora i eluiraju kasnije. Najmanje molekule, čiji je srednji hidrodinamički promjer manji od pora gela, mogu ući u sve pore. One eluiraju posljednje.

U idealnom slučaju, separaciju u potpunosti regulira veličina molekulskih vrsta, ali u praksi je teško izbjeći međudjelovanje barem nekih učinaka apsorpcije. Nejednoliko punjenje kolone i mrtvi volumeni mogu pogoršati stanje (2).

Detekcija se vrši, npr. refrakcijskim indeksom ili UV apsorpcijom, čime se dobije jednostavna krivulja raspodjele. Međutim, kako bi se krivulji dodale stvarne vrijednosti molekulskih težina, potrebno je kalibrirati kolonu prolaskom polimera poznate molekulske težine i, u idealnom slučaju, u širem smislu slične strukture, npr. raznih etalona polistirena. Tipični rezultati iz Gaussove krivulje ponekad iskrivljene manjim repom prema strani manje molekulske težine, kod koje okomita os pokazuje količinu, izraženu težinom, raznih molekulskih težina koje su eluirane, a vodoravna os logaritamsku molekulsku težinu.

▼B

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Ponovljivost (relativno odstupanje etalona: RSD) volumena eluiranja treba biti bolja od 0,3 %. Propisana ponovljivost analize mora se osigurati korekcijom putem internog etalona ako se kromatogram procjenjuje u zavisnosti od vremena i ne odgovara gore navedenom kriteriju (1). Polidisperzivnosti ovise o molekulskim težinama etalona. Kod etalona polistirena tipične vrijednosti su:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulska težina etalona na tjemenu krivulje eluacije)

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Priprema otopina polistirena za etalone**

Etaloni polistirena otapaju se opreznim miješanjem u odabranom eluentu. Kod pripreme otopina obvezno treba uzeti u obzir upute proizvođača.

Koncentracije odabranih etalona ovise o raznim čimbenicima, npr. volumenu ubrizgavanja, viskozitetu otopine i osjetljivosti analitičkog detektora. Maksimalni volumen ubrizgavanja mora se prilagoditi duljini kolone, kako bi se spriječilo prekomjerno punjenje. Za analitičke separacije metodom GPC s kolonom dimenzija 30 cm × 7,8 mm, tipični volumeni ubrizgavanja su obično između 40 i 100 µl. Veći volumeni su mogući, ali ne bi trebali prijeći 250 µl. Optimalni omjer između volumena ubrizgavanja i koncentracije mora se utvrditi prije stvarne kalibracije kolone.

1.6.2. **Priprema otopine uzorka**

U načelu, isti zahtjevi vrijede za pripremu otopina uzorka. Uzorak se otapa u odgovarajućem otapalu, npr. tetrahidrofuranu (THF), na način da se oprezno protrese. Ni u kom slučaju ne treba ga otapati pomoću ultrazvučne kupke. Po potrebi otopinu uzorka treba pročistiti preko membranskog filtra veličine pora između 0,2 i 2 µm.

Prisutnost neotopljenih čestica mora se zabilježiti u konačnom izvješću jer se kod vrsta velike molekulske težine one mogu javiti kao posljedica. Težinski postotak otopljenih čestica određuje se primjenom odgovarajuće metode. Otopine treba upotrijebiti u roku od 24 sata.

1.6.3. **Uređaj**

— spremnik za otapalo,

— otplinjač (ako je potrebno),

— crpka,

▼B

— ublaživač trzaja (ako je potrebno),

— sustav za ubrizgavanje,

— kromatografske kolone,

— detektor,

— mjerač protoka (ako je potrebno),

— uređaj za bilježenje i obradu podataka,

— posuda za otpad.

Mora se osigurati inertnost sustava za kromatografiju GPC s obzirom na otapala koja se koriste (što se postiže npr. uporabom čeličnih kapilara za otapalo THF).

1.6.4. **Ubrizgavanje i sustav dobave otapala**

Utvrđeni volumen otopine uzorka puni se u kolonu bilo uređajem za automatsko uzimanje uzorka ili ručno u točno određeno područje. Prebrzo povlačenje ili otpuštanje klipa brizgaljke, ako se radi ručno, može uzrokovati promjene u raspodjeli molekulske težine koja se promatra. Sustav dobave otapala trebao bi, koliko je to moguće, raditi bez trzaja, što se u idealnim uvjetima osigurava ublaživačem trzaja. Brzina protoka je 1 ml/min.

1.6.5. **Kolona**

U zavisnosti od uzorka, za karakterizaciju polimera koristi se ili jednostruka kolona ili nekoliko kolona povezanih u niz. Na tržištu postoji cijeli niz poroznih materijala za kolone, koji imaju određena svojstva (npr. veličinu pore, granice isključenja po veličini). Odabir separacijskoga gela ili duljine kolone ovisi kako o svojstvima uzorka (hidrodinamičkim volumenima, raspodjeli molekulske težine) tako i o konkretnim uvjetima separacije, kao što su otapalo, temperatura i brzina protoka (1)(2)(3).

1.6.6. **Teoretski stupnjevi**

Kolona ili kombinacija kolona koja se koristi za separaciju mora biti karakterizirana brojem teoretskih stupnjeva. To obuhvaća, u slučaju kad se kao otapalo za eluaciju koristi THF, punjenje otopine etil benzena ili neke druge pogodne nepolarne topljive tvari na kolonu poznate duljine. Broj teoretskih stupnjeva određen je sljedećom jednadžbom:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ili} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

gdje je:

N = broj teoretskih stupnjeva

V_e = volumen eluiranja na tjemenu krivulje eluiranja

▼B

W = širina osnovice krivulje

$W_{1/2}$ = širina krivulje na pola visine

1.6.7. **Učinkovitost separacije**

Osim broja teoretskih stupnjeva, što je količina koja određuje širinu pojasa, važna je učinkovitost separacije, a nju određuje kosina kalibracijske krivulje. Učinkovitost separacije kolone dobiva se iz sljedećeg odnosa:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{poprečni presjek kolone}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

gdje je:

$V_{e,Mx}$ = volumen eluiranja za polistiren molekulske težine M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = volumen eluiranja za polistiren 10 puta veće molekulske težine

Rezolucija sustava obično se definira kako slijedi:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

gdje je:

V_{e1}, V_{e2} = volumeni eluiranja dva etalona polistirena na tjemenu krivulje eluiranja

W_1, W_2 = širine osnovice krivulje

M_1, M_2 = molekulske težine na tjemenu krivulje (trebale bi se razlikovati faktorom 10)

R-vrijednost sustava kolona treba biti veća od 1,7 (4).

1.6.8. **Otapala**

Sva otapala moraju biti velike čistoće (za THF, uzima se čistoća od 99,5 %). Spremnik za otapalo (ako je potreban u atmosferi inertnog plina) mora biti dovoljno velik za kalibraciju kolona i nekoliko analiza uzorka. Prije nego se crpkom prenosi do kolone, otapalo se mora otpliniti.

1.6.9. **Regulacija temperature**

Temperatura kritičnih unutarnjih komponenata (petlje ubrizgavanja, kolona, detektora i cjevovoda) mora biti stalna i u skladu s izborom otapala.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Svrha detektora količinski je bilježiti koncentraciju uzorka eluiranog iz kolone. Kako bi se izbjeglo nepotrebno širenje krivulje, volumen kivete ćelije detektora mora se držati što je moguće manjim. Ne bi trebao biti veći od 10 µl, osim za detektore koji rade po metodama rasapa svjetlosti i viskozimetrije. Za detekciju se obično koristi diferencijalna refraktometrija. Međutim, ako je to potrebno zbog posebnih svojstava uzorka ili otapala za eluaciju, moguće je koristiti i druge tipove detektora, npr. UV/VIS, IR, viskozimetriju itd.

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Za pojedinosti u vezi s kriterijima procjene kao i za zahtjeve koji se odnose na prikupljanje i obradu podataka treba konzultirati normu DIN (1).

Za svaki je uzorak nužno provesti dva neovisna pokusa. Njih treba analizirati odvojeno.

Za svako mjerenje treba imati vrijednosti M_n, M_w, M_w/M_n i M_p. Potrebno je izričito navesti da su izmjerene vrijednosti relativne vrijednosti ekvivalentne molekulskim težinama etalona koji je upotrijebljen.

Nakon određivanja volumena retencije ili vremena retencije (koje je moguće korigirati upotrebom internog etalona), logaritamske se vrijednosti M_p (s tim da M_p predstavlja najviše točke krivulje kalibracijskog etalona) ucrtavaju u odnosu na jednu od tih količina. Najmanje dvije kalibracijske točke nužne su po dekadi molekulske težine, a najmanje pet mjernih točaka potrebno je za ukupnu krivulju, koja bi trebala obuhvatiti procijenjenu molekulsku težinu uzorka. Krajnja točka kalibracijske krivulje za malu molekulsku težinu definira se n-heksil benzenom ili drugom pogodnom nepolarnom topljivom tvari. Vrijednosti molekulskih težina M_n i M_w obično se utvrđuju elektronskom obradom podataka, koja se temelji na formulama iz odjeljka 1.2. Ako se koristi ručna obrada, upute se mogu naći u normi ASTM D 3536-91 (3).

Krivulja raspodjele mora biti u obliku tablice ili kao slika (diferencijalna frekvencija ili zbroj postotaka u odnosu na logaritamsku vrijednost M). U grafičkom prikazu, jedna dekada molekulske težine obično treba biti oko 4 cm u širinu, a najviša točka krivulje oko 8 cm u visinu. Kod integralnih krivulja raspodjele, razlika na ordinati između 0 i 100 % treba biti oko 10 cm.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće podatke:

2.2.1. **Ispitna tvar:**

— dostupne informacije o ispitivanoj tvari (identitet, aditivi, nečistoće),

▼B

— opis obrade uzorka, opažanja, problemi.

2.2.2. **Instrumentacija:**

— spremnik za eluent, inertni plin, otplinjavanje eluenta, sastav eluenta, nečistoće,

— crpka, ublaživač trzaja, sustav ubrizgavanja,

— kolone za separaciju (proizvođač, sve informacije o karakteristikama kolona, kao što su veličina pora, vrsta materijala za separaciju itd., broj, duljina i red kolona koje se koriste),

— broj teoretskih stupnjeva kolone (ili kombinacije), učinkovitost separacije (rezolucija sustava),

— informacije o simetriji tjemena krivulja,

— temperatura kolone, vrsta regulacije temperature,

— detektor (mjerno načelo, tip, volumen kivete),

— mjerač protoka, ako se koristi (proizvođač, mjerno načelo),

— sustav za bilježenje i obradu podataka (uređaji i računalni programi).

2.2.3. **Kalibracija sustava:**

— iscrpan opis metode koja se koristi za konstruiranje kalibracijske krivulje,

— informacije o kriterijima kvalitete za ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, zbroj kvadrata odstupanja itd.),

— informacije o svim ekstrapolacijama, pretpostavkama i približavanjima učinjenim tijekom postupka pokusa, kao i o procjeni i obradi podataka,

— sva mjerenja poduzeta radi konstruiranja kalibracijske krivulje moraju biti dokumentirana u tablici koja obuhvaća sljedeće informacije o svakoj točki kalibracije:

  — naziv uzorka,

  — proizvođač uzorka,

  — karakteristične vrijednosti etalona M_p, M_n, M_w i M_w/M_n koje je dao proizvođač ili koje proizlaze iz naknadnih mjerenja, zajedno s pojedinostima o metodi određivanja,

  — volumen ubrizgavanja i koncentracija ubrizgavanja,

▼B

— vrijednost M_p koja je upotrijebljena za kalibraciju,

— volumen eluiranja ili korigirano vrijeme retencije mjereno na tjemenu krivulje eluiranja,

— vrijednost M_p izračunana na tjemenu krivulje,

— postotak greške izračunane vrijednosti M_p i kalibracijska vrijednost.

2.2.4. **Procjena:**

— procjena na osnovi vremena: sve metode kojima se osigurava propisana mjerna obnovljivost (metoda korekcije, interni etalon itd.),

— informacija o tome je li procjena izvršena na temelju volumena eluiranja ili vremena retencije,

— informacije o ograničenjima procjene ako tjeme krivulje nije u potpunosti analizirano,

— opis metoda poravnavanja (rezultata), ako su korištene,

— priprema i postupci prethodne obrade uzorka,

— eventualna prisutnost neotopljenih čestica,

— volumen ubrizgavanja (µl) i koncentracija ubrizgavanja (mg/ml)

— opažanja o učincima koji vode do odstupanja od idealnog profila GPC,

— iscrpan opis svih izmjena postupaka ispitivanja,

— pojedinosti o područjima greške,

— sve ostale informacije i opažanja koja su bitna za tumačenje rezultata.

3. **REFERENCE**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Dodatak

Primjeri ostalih metoda za određivanje prosjeka molekulske težine (M_n) za polimere

Metoda kromatografije na permeabilnom gelu (GPC) poželjna je metoda za određivanje M_n, pogotovo ako je dostupan komplet etalona čija je struktura usporediva sa strukturom polimera. Međutim ako postoje praktične poteškoće u korištenju metode GPC, ili ako se unaprijed očekuje da tvar neće zadovoljiti regulatorni kriterij za M_n (što se mora potvrditi), dostupne su alternativne metode, kao npr.:

1. **Metoda koligativnih svojstava**

1.1. Ebulioskopija/Krioskopija

obuhvaća mjerenje podizanja vrelišta (ebulioskopija) ili spuštanja ledišta (krioskopija) otapala, ako se dodaje polimer. Metoda se zasniva na činjenici da učinak otopljenog polimera na vrelište/ledište tekućine zavisi o molekulskoj težini polimera (1)(2).

Primjenljivost, M_n < 20 000.

1.2. Snižavanje tlaka pare

obuhvaća mjerenje tlaka pare odabrane referentne tekućine prije i nakon dodavanja poznatih količina polimera (1)(2).

Primjenljivost, M_n < 20 000 (teoretski; međutim, njezina je vrijednost u praksi ograničena).

1.3. Membranska osmometrija

temelji se na načelu osmoze, tj. prirodne sklonosti molekula otapala da prolaze kroz polu-propusnu membranu iz razrijeđene u koncentriranu otopinu radi postizanja ravnoteže. U ispitivanju, razrijeđena otopina je nulte koncentracije, dok koncentrirana otopina sadrži polimer. Učinak provlačenja otapala kroz membranu uzrokuje diferencijalni tlak koji zavisi o koncentraciji i molekulskoj težini polimera (1)(3)(4).

Primjenljivost, M_n između 20 000-200 000.

1.4. Osmometrija faze pare

obuhvaća uspoređivanje brzine isparavanja aerosola čistog otapala do najmanje tri aerosola koji sadrže polimer u različitim koncentracijama (1)(2)(4).

Primjenljivost, M_n < 20 000.

▼B

2. **Analiza krajne grupe**

Za primjenu ove metode potrebno je poznavati i ukupnu strukturu polimera i vrstu lanca kojim završavaju krajnje grupe (koji se mora razlikovati od glavnog kostura po, npr. NMR ili titraciji/derivatizaciji). Određivanje molekulske koncentracije krajnjih grupa koje se nalaze na polimeru može dovesti do vrijednosti molekulske težine (7)(8)(9).

Primjenljivost, M_n do 50 000 (uz smanjenje pouzdanosti).

3. **Reference**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984) Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975) Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979) Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989) Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977) Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989) Vapour Pressure Osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989) Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975) End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990) Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **SADRŽAJ MALE MOLEKULSKE TEŽINE U POLIMERIMA**

1. **METODA**

Metoda kromatografije na permeabilnom gelu preslika je Smjernice OECD-a za ispitivanje TG 119 (1996.) Temeljna načela i daljnje tehničke informacije navedeni su u referencama.

1.1. UVOD

Kako su svojstva polimera veoma raznolika, nemoguće je opisati jednu metodu kojom se precizno utvrđuju uvjeti separacije i procjene koji obuhvaćaju sve slučajnosti i posebnosti do kojih dolazi kod separacije polimera. Posebno, složeni sustavi polimera često nisu pogodni za kromatografiju na permeabilnom gelu (GPC). Kad metoda GPC nije u praksi provediva, molekulske mase moguće je određivati drugim metodama (vidjeti Dodatak). U takvim slučajevima treba potanko obrazložiti zašto se određena metoda koristi.

Opisana metoda temelji se na normi DIN 55672 (1). Ta DIN norma sadrži iscrpne informacije o načinu na koji treba provoditi pokuse i procjenjivati podatke. Ako su izmjene uvjeta pokusa nužne, takve promjene treba opravdati. Dozvoljeno je koristiti druge norme ako se za njih u potpunosti navedu reference. U opisanoj metodi, za kalibraciju se koriste uzorci polistirena poznate polidisperzivnosti, i možda će je za određene polimere, npr. polimere dugih razgranatih lanaca i topljive u vodi, trebati prilagoditi.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Mala molekulska težina proizvoljno je definirana kao molekulska težina ispod 1 000 daltona.

Opći prosjek molekulske težine M_n i prosječna molekulska težina M_w određuju se sljedećim jednadžbama:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

gdje je:

H_i = razina detektorskog signala od osnovice za volumen retencije V_i

M_i = molekulska težina frakcije polimera kod volumena retencije V_i, a n je broj točaka s podacima

Širina raspodjele molekulske težine, kojom se mjeri disperzivnost sustava, određena je omjerom M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENTNE TVARI

Kako je kromatografija GPC relativna metoda, neophodno je provesti kalibraciju. Za to se obično koriste etaloni za usko raspodijeljene, linearno strukturirane polistirene poznatih prosječnih molekulskih težina M_n i M_w i poznate raspodjele molekulske težine. Kalibracijska krivulja može se koristiti za određivanje molekulske težine nepoznatog uzorka samo ako su uvjeti za separaciju uzorka i etaloni odabrani na istovjetan način.

Utvrđena veza između molekulske težine i volumena eluiranja vrijedi jedino pod konkretnim uvjetima svakog pojedinog pokusa. Ti uvjeti uključuju prije svega temperaturu, otapalo (ili mješavinu otapala), uvjete kromatografije i separacijsku kolonu ili sustav kolona.

Na taj način određene molekulske težine uzorka relativne su vrijednosti i opisujemo ih kao „ekvivalentne molekulske težine polistirena”. To znači da u ovisnosti o strukturnim i kemijskim razlikama između uzorka i etalona, molekulska težina može više ili manje odstupati od apsolutnih vrijednosti. Ako se koriste drugi etaloni, npr. polietilen glikol, polietilen oksid, polimetil metakrilat, poliakrilna kiselina, razlog za to treba navesti.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

GPC metodom moguće je odrediti kako raspodjelu molekulske težine uzorka tako i prosječne molekulske težine (M_n, M_w). GPC je poseban tip tekućinske kromatografije kod kojeg se uzorak separira prema hidrodinamičkim volumenima pojedinih komponenata (2).

Do separacije dolazi prolazom uzorka kroz kolonu koja je ispunjena poroznim materijalom, obično organskim gelom. Male molekule mogu penetrirati kroz pore dok se velike molekule isključuju. Dakle, put velikih molekula je kraći i one prve eluiraju. Molekule srednje veličine prolaze kroz neke od pora i eluiraju kasnije. Najmanje molekule, čiji je srednji hidrodinamički promjer manji od pora gela, mogu ući u sve pore. One eluiraju posljednje.

U idealnom slučaju, separaciju u potpunosti regulira veličina molekulskih vrsta, ali u praksi je teško izbjeći međudjelovanje barem nekih učinaka apsorpcije. Nejednoliko punjenje kolone i prazni volumeni mogu pogoršati stanje (2).

Detekcija se vrši npr. refrakcijskim indeksom ili UV apsorpcijom, čime se dobije jednostavna krivulja raspodjele. Međutim, kako bi se krivulji dodale stvarne vrijednosti molekulskih težina, potrebno je kalibrirati kolonu prolaskom polimera poznate molekulske težine, i u idealnom slučaju, u širem smislu slične strukture, npr. raznih etalona polistirena. Tipični rezultati iz Gaussove krivulje, ponekad iskrivljene manjim repom prema strani manje molekulske težine, kod koje okomita os pokazuje količinu, izraženu težinom, raznih molekulskih težina koje su eluirane, a vodoravna os logaritamsku molekulsku težinu.

▼B

Iz te krivulje izvodi se sadržaj male molekulske težine. Izračun može biti točan samo ako se vrste polimera malih molekulskih težina na isti način odnose prema jedinici mase, kao prema polimeru u cjelini.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Ponovljivost (relativno odstupanje etalona: RSD) volumena eluiranja treba biti bolja od 0,3 %. Propisana ponovljivost analize mora se osigurati korekcijom putem internog etalona ako se kromatogram procjenjuje u zavisnosti od vremena, i ne odgovara gore navedenom kriteriju (1). Polidisperzivnosti ovise o molekulskim težinama etalona. Kod etalona polistirena tipične vrijednosti su:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulska težina etalona na tjemenu krivulje eluiranja)

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Priprema otopina polistirena za etalone**

Etaloni polistirena otapaju se opreznim miješanjem u odabranom eluentu. U pripremi otopina obvezno treba uzeti u obzir upute proizvođača.

Koncentracije odabranih etalona ovise o raznim čimbenicima, npr. volumenu ubrizgavanja, viskoznosti otopine i osjetljivosti analitičkog detektora. Maksimalni volumen ubrizgavanja mora se prilagoditi duljini kolone, radi sprečavanja prekomjernog punjenja. Za analitičke separacije metodom GPC s kolonom dimenzija 30 cm × 7,8 mm, tipični volumeni ubrizgavanja su obično između 40 i 100 µl. Veći volumeni su mogući, ali ne bi trebali prijeći 250 µl. Optimalni omjer između volumena ubrizgavanja i koncentracije mora se utvrditi prije stvarne kalibracije kolone.

1.6.2. **Priprema otopine uzorka**

U načelu, isti zahtjevi vrijede za pripremu otopina uzorka. Uzorak se otapa u odgovarajućem otapalu, npr. tetrahidrofuranu (THF), na način da se oprezno protrese. Ni u kom slučaju ne treba ga otapati pomoću ultrazvučne kupke. Po potrebi, otopinu uzorka treba pročistiti preko membranskog filtra veličine pora između 0,2 i 2 µm.

Prisutnost neotopljenih čestica mora se zabilježiti u konačnom izvješću jer one mogu biti posljedica vrsta velike molekulske težine. Težinski postotak neotopljenih čestica određuje se primjenom odgovarajuće metode. Otopine treba upotrijebiti u roku od 24 sata.

▼B

1.6.3. **Korekcija radi sadržaja nečistoća i aditiva**

Korekcija sadržaja vrsta koje imaju M < 1 000 za prinos iz prisutnih konkretnih nepolimernih komponenata (npr. nečistoća i/ili aditiva) obično je potrebna, ako izmjereni sadržaj već nije < 1 %. To se postiže neposrednom analizom otopine polimera ili eluata koji se koristi u metodi GPC.

Ako je eluat nakon prolaza kroz kolonu prerazrijeđen za daljnju analizu, potrebno ga je koncentrirati. Možda će eluat trebati prvo u potpunosti ispariti, a zatim ga ponovno otopiti. Koncentriranje eluata mora se vršiti pod uvjetima koji osiguravaju da na eluatu neće doći ni do kakvih promjena. Postupak s eluatom nakon uporabe u GPC-u ovisi o analitičkoj metodi koja je primijenjena za količinsko određivanje.

1.6.4. **Uređaj**

Uređaj GPC obuhvaća sljedeće komponente:

— spremnik za otapalo,

— otplinjač (ako je potrebno),

— crpku,

— ublaživač trzaja (ako je potrebno)

— sustav za ubrizgavanje,

— kromatografske kolone,

— detektor,

— mjerač protoka (ako je potrebno),

— uređaj za bilježenje i obradu podataka – procesor,

— posudu za otpad.

Mora se osigurati inertnost sustava za kromatografiju GPC s obzirom na otapala koja se koriste (što se postiže npr. uporabom čeličnih kapilara za otapalo THF).

1.6.5. **Ubrizgavanje i sustav dobave otapala**

Utvrđeni volumen otopine uzorka puni se u kolonu bilo uređajem za automatsko uzimanje uzorka ili ručno u točno određeno područje. Prebrzo povlačenje ili otpuštanje klipa brizgaljke, ako se radi ručno, može uzrokovati promjene u raspodjeli molekulske težine koja se promatra. Sustav dobave otapala trebao bi, koliko je to moguće, raditi bez trzaja, što se u idealnim uvjetima osigurava ublaživačem trzaja. Brzina protoka je reda veličine 1 ml/min.

1.6.6. **Kolona**

U zavisnosti od uzorka, za karakterizaciju polimera koristi se ili jednostruka kolona ili nekoliko kolona povezanih u niz. Na tržištu postoji cijeli niz poroznih materijala za kolone, koji imaju određena svojstva (npr. veličinu pore, granice isključenja po veličini). Odabir separacijskoga gela ili duljine kolone ovisi kako o svojstvima uzorka (hidrodinamičkim volumenima, raspodjeli molekulske težine) tako i o konkretnim uvjetima separacije, kao što su otapalo, temperatura i brzina protoka (1)(2)(3).

▼B

1.6.7. **Teoretski stupnjevi**

Kolona ili kombinacija kolona koja se koristi za separaciju mora biti karakterizirana brojem teoretskih stupnjeva. To obuhvaća, u slučaju kad se kao otapalo za eluaciju koristi THF, punjenje otopine etil benzena ili neke druge pogodne nepolarne topljive tvari na kolonu poznate duljine. Broj teoretskih stupnjeva određen je sljedećom jednadžbom:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ili} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

gdje je:

N = broj teoretskih stupnjeva

V_e = volumen eluiranja na tjemenu krivulje eluiranja

W = širina osnovice krivulje

$W_{1/2}$ = širina krivulje na pola visine

1.6.8. **Učinkovitost separacije**

Osim broja teoretskih stupnjeva, što je količina koja određuje širinu pojasa, važna je učinkovitost separacije, a nju određuje kosina kalibracijske krivulje. Učinkovitost separacije kolone dobiva se iz sljedećeg odnosa:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{poprečni presjek kolone}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

gdje je:

$V_{e,Mx}$ = volumen eluiranja za polistiren molekulske težine M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = volumen eluiranja za polistiren 10 puta veće molekulske težine

Rezolucija sustava obično se definira kako slijedi:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

gdje je:

V_{e1}, V_{e2} = volumeni dva etalona polistirena na tjemenu krivulje eluiranja

W_1, W_2 = širine osnovice krivulje

M_1, M_2 = molekulske težine na tjemenu krivulje (trebali bi se razlikovati faktorom 10)

R-vrijednost sustava kolona treba biti veća od 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Otapala**

Sva otapala moraju biti velike čistoće (za THF, uzima se čistoća od 99,5 %). Spremnik za otapalo (ako je potreban u atmosferi inertnog plina) mora biti dovoljno velik za kalibraciju kolona i nekoliko analiza uzorka. Prije nego se crpkom prenosi do kolone, otapalo se mora otpliniti.

1.6.10. **Regulacija temperature**

Temperatura kritičnih unutarnjih komponenata (petlje ubrizgavanja, kolona, detektora i cjevovoda) mora biti stalna, i u skladu s izborom otapala.

1.6.11. **Detektor**

Svrha detektora je količinski bilježiti koncentraciju uzorka eluiranog iz kolone. Kako bi se izbjeglo nepotrebno širenje krivulje, volumen kivete ćelije detektora mora se držati što je moguće manjim. Ne bi trebao biti veći od 10 µl, osim za detektore koji rade po metodama rasapa svjetlosti i viskozimetrije. Za detekciju se obično koristi diferencijalna refraktometrija. Međutim, ako je to potrebno zbog posebnih svojstava uzorka ili otapala za eluaciju, moguće je koristiti i druge tipove detektora, npr. UV/VIS, IR, viskozimetriju itd.

1. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Za pojedinosti u vezi s kriterijima procjene kao i za zahtjeve koji se odnose na prikupljanje i obradu podataka treba konzultirati DIN normu (1).

Za svaki je uzorak nužno provesti dva neovisna pokusa. Te pokuse treba analizirati odvojeno. Uvijek je bitno odrediti i podatke iz slijepih proba koje su napravljene pod istim uvjetima kao s uzorkom.

Treba izričito navesti da su izmjerene vrijednosti relativne vrijednosti ekvivalentne molekulskim težinama etalona koji je upotrijebljen.

Nakon određivanja volumena retencije ili vremena retencije (koje je moguće korigirati upotrebom internog etalona), logaritamske se vrijednosti M_p (s tim da M_p predstavlja najviše točke krivulje kalibracijskog etalona) ucrtavaju u odnosu na jednu od tih količina. Barem dvije kalibracijske točke nužne su po dekadi molekulske težine, a barem pet mjernih točaka potrebno je za ukupnu krivulju, koja bi trebala obuhvatiti procijenjenu molekulsku težinu uzorka. Krajnja točka kalibracijske krivulje za malu molekulsku težinu definira se n-heksil benzenom ili drugom pogodnom nepolarnom topljivom tvari. Dio krivulje koji odgovara molekulskim težinama ispod 1 000 određuje se i po potrebi ispravlja za nečistoće i aditive. Krivulje eluacije obično se procjenjuju elektronskom obradom podataka. Ako se koristi ručna obrada, upute se mogu naći u normi ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Ako se na koloni zadržao koji netopljivi polimer, njegova molekulska težina vjerojatno je veća od težine topljive frakcije, i ako se ne uzme u obzir, sadržaj malih molekulskih težina će biti precijenjen. Smjernice za korekcije sadržaja male molekulske težine za netopljive polimere navedene su u Dodatku.

Krivulja raspodjele mora biti u obliku tablice ili kao slika (diferencijalna frekvencija ili zbroj postotaka naprema logaritamskoj vrijednosti M). U grafičkom prikazu, jedna dekada molekulske težine treba obično biti oko 4 cm u širinu, a najviša točka krivulje oko 8 cm u visinu. Kod integralnih krivulja raspodjele, razlika na ordinati između 0 i 100 % treba biti oko 10 cm.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

2.2.1. **Ispitivana tvar:**

— dostupne informacije o tvari koja se ispituje (identitet, aditivi, nečistoće),

— opis obrade uzorka, opažanja, problemi.

2.2.2. **Instrumentacija:**

— spremnik za eluent, inertni plin, otplinjavanje eluenta, sastav eluenta, nečistoće,

— crpka, ublaživač trzaja, sustav ubrizgavanja,

— kolone za separaciju (proizvođač, sve informacije o karakteristikama kolona, kao što su veličina pora, vrsta materijala za separaciju itd., broj, duljina i red kolona koje se koriste),

— broj teoretskih stupnjeva kolone (ili kombinacije), učinkovitost separacije (rezolucija sustava),

— informacije o simetriji krivulja eluiranja,

— temperatura kolone, vrsta regulacije temperature,

— detektor (mjerno načelo, tip, volumen kivete),

— mjerač protoka, ako se koristi (proizvođač, mjerno načelo),

— sustav za bilježenje i obradu podataka (uređaji i računalni programi).

2.2.3. **Kalibracija sustava:**

— iscrpan opis metode koja se koristi za konstruiranje kalibracijske krivulje,

▼B

— informacije o kriterijima kvalitete za ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, zbroj kvadrata odstupanja itd.),

— informacije o svim ekstrapolacijama, pretpostavkama i približavanjima učinjenim tijekom postupka pokusa, kao i o procjeni i obradi podataka,

— sva mjerenja poduzeta radi konstruiranja kalibracijske krivulje moraju biti dokumentirana u tablici koja obuhvaća sljedeće informacije o svakoj točki kalibracije:

  — naziv uzorka,

  — proizvođač uzorka,

  — karakteristične vrijednosti etalona M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, koje je dao proizvođač ili koje proizlaze iz naknadnih mjerenja, zajedno s pojedinostima o metodi određivanja,

  — volumen ubrizgavanja i koncentracija ubrizgavanja,

  — vrijednost M_p koja je upotrijebljena za kalibraciju,

  — volumen eluiranja ili korigirano vrijeme retencije mjereno na tjemenu krivulje,

  — vrijednost M_p izračunana na tjemenu krivulje,

  — postotak greške izračunane vrijednosti M_p i kalibracijska vrijednost.

2.2.4. **Informacije o sadržaju male molekulske težine u polimerima:**

— opis metoda koje su primijenjene u analizi i način na koji su pokusi rađeni,

— informacije o postotku sadržaja vrsta male molekulske težine,

— informacije o nečistoćama, aditivima i ostalim nepolimerskim vrstama u težinskom postotku u odnosu na ukupan uzorak.

2.2.5. **Procjena:**

— procjena na osnovi vremena; sve metode kojima se osigurava propisana mjerna obnovljivost (metoda korekcije, interni etalon itd.),

— informacija o tome je li procjena izvršena na temelju volumena eluiranja ili vremena retencije,

— informacije o ograničenjima procjene ako krivulja nije u potpunosti analizirana,

— opis metoda poravnavanja (rezultata), ako su korištene,

— priprema i postupci prethodne obrade uzorka,

— eventualna prisutnost neotopljenih čestica,

▼B

— volumen ubrizgavanja (µl) i koncentracija ubrizgavanja (mg/ml),

— opažanja o učincima koji vode do odstupanja od idealnog profila GPC,

— iscrpan opis svih izmjena u postupcima ispitivanja,

— pojedinosti o područjima greške,

— sve ostale informacije i opažanja koja su bitna za tumačenje rezultata.

3. **REFERENCE**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979) Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Dodatak

Smjernice za korekciju sadržaja male molekulske mase s obzirom na prisutnost netopljivih polimera

Prisutnost netopljivog polimera u uzorku ima za posljedicu gubitak mase tijekom analize metodom GPC. Netopljivi polimer trajno se zadržava na koloni ili filtru uzorka dok topljivi dio uzorka prolazi kroz kolonu. Ako je prirast refrakcijskog indeksa (dn/dc) polimera moguće procijeniti ili izmjeriti, moguće je procijeniti i gubitak mase uzorka na koloni. U tom se slučaju radi korekcija putem vanjske kalibracije, a za etalone se uzimaju materijali poznate koncentracije i omjera dn/dc, kako bi se kalibrirala reakcija refraktometra. U primjeru koji slijedi kao etalon upotrijebljen je poli(metil metakrilat) (pMMA).

U vanjskoj kalibraciji, za analizu akrilnih polimera, etalon pMMA poznate koncentracije u tetrahidrofuranu, analiziran je metodom GPC, a dobiveni podaci upotrijebljeni su kako bi se odredila konstanta refraktometra prema jednadžbi:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

gdje je:

K = konstanta refraktometra (u mikrovolt sekundama/ml),

R = reakcija etalona pMMA (u mikrovolt/sekundi),

C = koncentracija etalona pMMA (u mg/ml),

V = volumen ubrizgavanja (u ml), i

dn/dc = prirast refrakcijskog indeksa za pMMA u tetrahidrofuranu (u ml/mg)

Sljedeći podaci tipični su za etalon pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Dobivena vrijednost K $3{,}05 \times 10^{11}$ zatim se koristi za izračun teoretske reakcije detektora ako je 100 % ubrizganog polimera eluiralo kroz detektor.

▼B

A.20. **PONAŠANJE POLIMERA U VODI - OTAPANJE/EKSTRAKCIJA**

1. **METODA**

Opisana metoda preslika je Smjernice OECD-a za ispitivanje TG 120 (1997.). Daljnje tehničke informacije navedene su u referenci (1).

1.1. UVOD

Za određene polimere, kao što su emulzijski polimeri, prije primjene metode opisane dalje u tekstu možda će trebati izvršiti određene pripremne radnje. Metoda nije primjenljiva na tekuće polimere niti na polimere koji u ispitnim uvjetima reagiraju s vodom.

Kad metoda nije praktična ili nije moguća, ponašanje kod otapanja/ekstrakcije moguće je istražiti drugim metodama. U takvim slučajevima, odabranu metodu treba iscrpno opisati i opravdati.

1.2. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ponašanje polimera kod otapanja/ekstrakcije u vodenom mediju utvrđuje se primjenom metode tikvice (vidjeti A.6. Topljivost u vodi, metoda tikvice) uz izmjene opisane u daljnjem tekstu.

1.4. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Oprema**

Za ovu metodu potrebna je sljedeća oprema:

— uređaj za drobljenje, npr. mlin za dobivanje čestica poznate veličine,

— uređaj za protresanje s mogućnošću regulacije temperature,

— membranski sustav za filtriranje,

— odgovarajuća analitička oprema,

— standardizirana sita.

1.5.2. **Priprema uzorka**

Reprezentativni uzorak prvo treba smanjiti na čestice veličine između 0,125 i 0,25 mm upotrebom odgovarajućih sita. Radi održavanja stabilnosti uzorka ili radi postupka mljevenja možda će biti potrebno hlađenje. Gumaste materijale moguće je smrviti na temperaturi tekućeg dušika (1).

Ako nije moguće postići potrebnu veličinu čestica, treba poduzeti radnje da se čestice što je moguće više smanje, te o tome treba izraditi izvješće. U tom izvješću treba navesti na koji je način smrvljeni uzorak bio skladišten prije ispitivanja.

▼B

1.5.3. **Postupak**

Tri uzorka po 10 g ispitne tvari odvagnu se u tri zasebne posude opremljene staklenim čepovima i u svaku se posudu doda 1 000 ml vode. Ako se rukovanje količinom od 10 g polimera pokaže nepraktičnim, treba uzeti prvu sljedeću količinu kojom se može rukovati i njoj prilagođen volumen vode.

Posude se čvrsto začepe i zatim tresu na 20 °C. Treba upotrijebiti uređaj za protresanje ili miješanje koji radi na stalnoj temperaturi. Nakon razdoblja od 24 sata, sadržaj svake posude se centrifugira ili filtrira, a koncentracija polimera u čistoj vodenoj fazi utvrđuje se odgovarajućom analitičkom metodom. Ako odgovarajuće analitičke metode za vodenu fazu nisu dostupne, ukupnu je topljivost/sposobnost ekstrakcije moguće procijeniti iz suhe težine taloga na filtru ili centrifugiranog precipitata.

Obično je potrebno količinski razlikovati nečistoće i aditive s jedne strane i vrste male molekulske težine s druge strane. U slučaju određivanja gravimetrijom, isto tako je važno napraviti slijepu probu bez ispitne tvari radi uzimanja u obzir taloga koji nastaju u postupku pokusa.

Ponašanje polimera kod otapanja/ekstrakcije u vodi na 37 °C kod pH 2 i pH 9 može se utvrditi na isti način kao što je opisano za provođenje pokusa na 20 °C. pH vrijednosti moguće je postići dodavanjem bilo odgovarajućih pufera ili odgovarajućih kiselina ili lužina, kao što su klorovodična kiselina, octena kiselina, natrij analitičke kvalitete, ili kalijev hidroksid, ili NH_3.

Ovisno o metodi analize koja se primjenjuje treba provesti jedno ili dva ispitivanja. Ako su dostupne dovoljno konkretne metode za izravnu analizu vodene faze za polimernu komponentu, dovoljno je jedno ispitivanje kao što je opisano u gornjem tekstu. Međutim, ako takve metode nisu dostupne pa se utvrđivanje ponašanja polimera kod otapanja/ekstrakcije ograničava na posredne analize utvrđivanjem samo ukupnog sadržaja organskog ugljika (TOC) vodenog ekstrakta, treba provesti i dodatno ispitivanje. To dodatno ispitivanje treba također provesti tri puta, uporabom 10 puta manjih uzoraka polimera i istih količina vode od onih koje su bile upotrijebljene u prvom ispitivanju.

1.5.4. **Analiza**

1.5.4.1. *Ispitivanje koje se provodi na uzorku jedne veličine*

Možda su dostupne metode za neposrednu analizu polimerne komponente u vodenoj fazi. Alternativno, moguće je razmotriti primjenu posredne analize otopljenih/izdvojenih polimernih komponenata utvrđivanjem ukupnog sadržaja topljivih dijelova i korekcijom za komponente koje nisu konkretno polimerne.

Analiza vodene faze ukupnih polimerskih vrsta moguća je:

nekom dovoljno osjetljivom metodom, npr.

— određivanjem ukupnog sadržaja organskog ugljika digestijom persulfata ili dikromata kojom nastaje CO_2, nakon čega se vrši procjena metodom IR ili kemijskom analizom,

▼B

— spektrometrijom atomske apsorpcije (AAS) ili njenim induktivno spregnutim plazma (ICP) emisijskim ekvivalentom za polimere koji sadrže silicij ili metale,

— UV apsorpcijom ili spektrofluorometrijom za aril polimere,

— LC-MS (tekućinskom kromatografijom - masenom spektrometrijom) za uzorke male molekulske težine,

ili evaporacijom u vakuumu do isušivanja vodenog ekstrakta, i spektroskopijom (IR, UV itd.) ili AAS/ICP analizom taloga.

Ako takva analiza vodene faze nije praktična, vodeni ekstrakt treba izdvojiti organskim otapalom koje se ne miješa s vodom, npr. kloriranim ugljikohidratom. Otapalo tada ishlapi, a talog se analizira s obzirom na prijavljeni sadržaj polimera, na način opisan u gornjem tekstu. Komponente koje se u tomu talogu utvrde kao nečistoće ili aditivi treba suptrahirati radi utvrđivanja stupnja otapanja/ekstrakcije samog polimera.

Kad su prisutne relativno velike količine takvih materijala, talog će možda trebati podvrći analizi, npr. HPLC (visokodjelotvornoj tekućinskoj kromatografiji) ili GC (plinskoj kromatografiji), radi razlikovanja nečistoća od monomera i vrsta koje potječu od monomera, kako bi se mogao odrediti sadržaj ovih potonjih.

U nekim slučajevima, obično ishlapljivanje organskog otapala do potpune suhoće i vaganje suhog taloga može biti dovoljno.

1.5.4.2. *Ispitivanje koje se provodi na dvije različite veličine uzorka*

Svi vodeni ekstrakati analiziraju se s obzirom na ukupni sadržaj organskog ugljika.

Gravimetrijsko određivanje provodi se na neotopljenom/neizdvojenom dijelu uzorka. Ako, nakon centrifugiranja ili filtriranja sadržaja svake posude, talog polimera ostane na stjenkama posude, posudu treba ispirati filtratom sve dok se sav vidljiv talog ne ukloni. Nakon toga, filtrat se ponovno centrifugira ili filtrira. Talog koji preostaje na filtru ili na cijevi centrifuge suši se na 40 °C u vakuumu i važe. Sušenje se nastavlja dok se ne postigne stalna težina.

2. **PODACI**

2.1. ISPITIVANJE PROVEDENO NA UZORKU JEDNE VELIČINE

Pojedinačne rezultate za svaku od tri tikvice i prosječne vrijednosti treba izraziti u jedinicama mase po volumenu otopine (obično mg/l) ili mase po masi uzorka polimera (obično mg/g). Osim toga, treba navesti i gubitak težine uzorka (koji se izračunava kao težina topljive tvari podijeljena početnom težinom uzorka). Relativna odstupanja etalona (RSD) treba izračunati. Podatke treba dati odvojeno za ukupnu tvar (polimer + glavni aditivi itd.) i odvojeno samo za polimer (tj. nakon oduzimanja udjela aditiva).

▼B

2.2. ISPITIVANJE PROVEDENO NA DVIJE RAZLIČITE VELIČINE UZORKA

Pojedinačne vrijednosti ukupnog sadržaja ugljika vodenih ekstrakata iz dvaju trostrukih pokusa i prosječnu vrijednost za svaki pokus treba izraziti u jedinicama mase po volumenu otopine (obično mgC/l), ali i u jedinicama mase po početnoj težini uzorka (obično mgC/g).

Ako nema razlike između rezultata velikih i malih omjera uzorak/voda, to može ukazivati da su sve izdvojive komponente zaista izdvojene. U tom slučaju, izravna analiza obično nije potrebna.

Pojedinačne težine taloga treba izraziti u postotku početnih težina uzoraka. Za svaki pokus treba izračunati prosječnu vrijednost. Razlike između 100 % i utvrđenog postotka predstavljaju topljiv i izdvojiv materijal u prvobitnom uzorku.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

3.1.1. **Ispitivana tvar:**

— dostupne informacije o tvari koja se ispituje (identitet, aditivi, nečistoće, sadržaj vrsta male molekulske težine).

3.1.2. **Uvjeti pokusa:**

— opis primijenjenih postupaka i uvjeta pokusa,

— opis analitičke metode i metode otkrivanja.

3.1.3. **Rezultati:**

— rezultati topljivosti/sposobnosti ekstrakcije u mg/l; pojedinačne i srednje vrijednosti za ispitivanja ekstrakcije u raznim otopinama, razložene na sadržaj polimera i nečistoće, aditive itd.,

— rezultati topljivosti/sposobnosti izdvajanja u mg/g polimera,

— vrijednosti ukupnog sadržaja ugljika vodenih ekstrakata, težina topljive tvari i izračunani postoci, ako je mjereno,

— pH vrijednost svakog uzorka,

— informacije o vrijednostima dobivenim u slijepim probama,

— po potrebi, upute na kemijsku nestabilnost tvari koja se ispituje, tijekom postupka ispitivanja i postupka analize,

— sve informacije koje su važne za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. SVOJSTVA OKSIDACIJE (TEKUĆINE)

1. METODA

1.1. UVOD

Ova je ispitna metoda namijenjena za određivanje sposobnosti tekuće tvari da poveća brzinu gorenja ili jačinu gorenja zapaljive tvari, ili da sa zapaljivom tvari formira mješavinu koja će se spontano zapaliti ako se te dvije tvari homogeno izmiješaju. Temelji se na UN-ovom testu za oksidirajuće tekućine (1) i ekvivalentna je tom pokusu. Međutim, budući da je metoda A.21. razvijena prvenstveno kako bi se udovoljilo zahtjevima Uredbe (EZ) br. 1907/2006, propisuje se usporedba sa samo jednom referentnom tvari. Ispitivanje i uspoređivanje s dodatnim referentnim tvarima može biti potrebno ako se očekuje da se rezultati ispitivanja koriste u druge svrhe ([1]).

Ovaj test ne treba provoditi kad je ispitivanjem strukturne formule sa sigurnošću utvrđeno da tvar nije u stanju egzotermno reagirati sa zapaljivim materijalom.

Prije provođenja ovog ispitivanja korisno je posjedovati preliminarne informacije o mogućim eksplozivnim svojstvima tvari.

Ovo se ispitivanje ne primjenjuje na krutine, plinove, eksplozivne ili lako zapaljive tvari, ili organske perokside.

Ovo ispitivanje nije nužno provoditi ako su za ispitivanu tvar već dostupni rezultati u okviru UN-ovog ispitivanja za oksidirajuće tekućine (1).

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Srednje vrijeme porasta tlaka je prosječno izmjereno vrijeme u kojem mješavina koja se ispituje proizvede porast tlaka od 690 kPa do 2 070 kPa iznad atmosferskog tlaka.

1.3. REFERENTNA TVAR

Propisano je da referentna tvar bude 65 % (m/m) vodena nitritna kiselina (analitičke kvalitete) ([2]).

([1]) Primjerice, u okviru UN-ovih propisa o prijevozu.
([2]) Kiselinu prije ispitivanja treba podvrći titranju kako bi se potvrdila njezina koncentracija.

▼B

Postoji mogućnost da, ako ispitivač predvidi da bi se rezultati ovog ispitivanja mogli koristiti u druge svrhe ([1]), je prikladno ispitati i druge referentne tvari ([1]).

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Tekućina koje se ispituje miješa se s vlaknastom celulozom u omjeru 1 prema 1 masenog udjela i uvodi u tlačnu posudu. Ako tijekom miješanja ili punjenja spontano dođe do zapaljenja, daljnje ispitivanje nije potrebno.

Ako do spontanog zapaljenja ne dođe, provodi se puno ispitivanje. Mješavina se zagrijava u tlačnoj posudi te se određuje srednje vrijeme koje je potrebno da bi se tlak podigao s 690 kPa na 2 070 kPa iznad atmosferskog. To se uspoređuje sa srednjim vremenom porasta temperature za mješavinu 1:1 jedne ili više referentnih tvari i celuloze.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

U nizu od pet pokusa s jednom tvari niti jedan rezultat ne bi se smio razlikovati od aritmetičke sredine za više od 30 %. Rezultate koji se od aritmetičke sredine razlikuju za više od 30 % treba odbaciti, poboljšati postupak miješanja i punjenja te ponoviti ispitivanje.

1.6. OPIS METODE

1.6.1. **Priprema**

1.6.1.1. *Zapaljiva tvar*

Kao zapaljivi materijal koristi se sušena, vlaknasta celuloza duljine vlakana između 50 i 250 μm i srednjeg promjera vlakana 25 μm ([2]). Suši se na stalnu težinu u sloju debljine najviše 25 mm na 105 °C tijekom četiri sata i drži u eksikatoru, sa sredstvom za upijanje vlage, dok se ne ohladi i bude potrebna za upotrebu. Sadržaj vode sušene celuloze treba biti manji od 0,5 % suhe mase ([3]). Po potrebi, vrijeme sušenja treba produžiti kako bi se to postiglo ([4]). U cijelom ispitivanju treba koristiti istu partiju celuloze.

([1]) Npr.: u referenci 1. rabi se 50 % (m/m) perklorna kiselina i 40 % (m/m) natrijev klorat.
([2]) Npr. celuloza u prahu Whatman za kromatografiju na koloni CF 11, kataloški broj 4021 050.
([3]) Potvrđeno, npr. Karl-Fisherovom titracijom.
([4]) Alternativno, taj sadržaj vode može se postići i npr. grijanjem na 105 °C pod vakuumom tijekom 24 sata.

▼B

1.6.1.2. *Uređaj*

1.6.1.2.1. Tlačna posuda

Potrebna je tlačna posuda. To je cilindrična čelična tlačna posuda dugačka 89 mm, vanjskog promjera 60 mm (vidjeti sliku 1.). Na suprotnim stranama strojno su obrađene dvije ravnine (koje smanjuju poprečni presjek posude na 50 mm) kako bi se olakšalo držanje prilikom ugradnje mehanizma za paljenje i odzračnika. Posuda, koja ima provrt promjera 20 mm, s unutrašnje strane na oba kraja smanjena je na dubinu od 19 mm i urezan je navoj za cijev 1" prema Britanskom standardu za cijevi (BSP) ili drugoj ekvivalentnoj metričkoj normi. Ventil za oduzimanje tlaka, u obliku bočno postavljenog rukavca, vijkom je pričvršćen za zakrivljenu površinu tlačne posude 35 mm od jednog kraja i na 90° prema strojno obrađenim ravninama. Podloga za to probušena je do dubine od 12 mm i ima urezan navoj za cijev 1/2" prema BSP-u ili drugoj ekvivalentnoj metričkoj normi, u koji se pričvršćuje bočni rukavac. Po potrebi ugrađuje se brtva od inertnog materijala kako bi se osigurala plinonepropusnost. Bočni rukavac izlazi iz tijela tlačne posude u duljinu od 55 mm i ima provrt od 6 mm. Kraj rukavca je smanjen i ima navojni priključak za pretvarač tlaka s dijafragmom. Može se koristiti bilo koja vrsta mjerača tlaka pod uvjetom da na njega ne djeluju vrući plinovi ili proizvodi razlaganja i da je u stanju reagirati na brzine porasta tlaka od 690-2 070 kPa u najviše 5 ms.

Kraj tlačne posude koji je najdalje od bočnog rukavca zatvoren je mehanizmom za paljenje koji ima dvije elektrode, jednu izoliranu od tijela mehanizma, a drugu uzemljenu. Drugi kraj tlačne posude zatvoren je rasprskavajućom pločom (tlak raspsrkavanja približno 2 200 kPa) učvršćen je vijkom s provrtom od 20 mm. Po potrebi, uz mehanizam za paljenje ugrađuje se brtva od inertnog materijala, čime se osigurava plinonepropusnost. Potporni stalak (Slika 2.) drži cijeli sklop u pravilnom položaju tijekom upotrebe. Stalak se obično sastoji od temeljne ploče od mekog čelika veličine 235 mm × 184 mm × 6 mm i šupljeg četvrtastog profila 70 mm × 70 mm × 4 mm, dugačkog 185 mm.

S jednog kraja četvrtastog profila izrezane su po dužini dvije nasuprotne stranice, na način da se iznad dobije konstrukcija dijela netaknutog kućišta dužine 86 mm na dvije noge ravnih stranica. Krajevi tih ravnih stranica odrežu se pod kutom od 60° na horizontalnu ravninu i zavare na temeljnu ploču. Na jednoj strani gornjeg kraja podloge strojno se obradi utor 22 mm širine × 46 mm dubine kako bi se, kad se sklop tlačne posude spusti u potporni stalak dijela kućišta, s tim da prvo ide kraj s mehanizmom za paljenje, bočni rukavac namjestio u utor. Na donju unutarnju površinu dijela kućišta zavari se komad čelika širine 30 mm i debljine 6 mm koji ima ulogu držača razmaka. Dva 7 milimetarska pritezna vijka postavljena u suprotne strane čvrsto drže tlačnu posudu. S donje strane tlačnu posudu nose dvije 12 mm široke čelične trake debljine 6 mm zavarene na bočne strane podnožja kućišta.

▼B

1.6.1.2.2. Sustav paljenja

Sustav paljenja sastoji se od Ni/Cr žice duljine 25 cm promjera 0,6 mm i otpora 3,85 om/m. Žica je namotana na šipku promjera 5 mm, u obliku svitka i prigrađena na elektrode mehanizma za paljenje. Svitak bi trebao imati jedan od oblika prikazanih na slici 3. Razmak između dna posude i donje strane svitka za paljenje treba biti 20 mm. Ako elektrode nisu podesive, krajeve žice za paljenje između svitka i dna posude treba izolirati keramičkom oblogom. Žica se grije stalnim izvorom koji može dati struju jačine najmanje 10 A.

1.6.2. **Provođenje ispitivanja** ([1])

Potpuno montiran uređaj zajedno s pretvornikom tlaka i sustavom zagrijavanja, ali bez postavljenog rasprskavajućeg diska, postavljen je u svoj stalak mehanizmom za paljenje prema dolje. 2,5 g tekućine koja se ispituje miješa se s 2,5 g sušene celuloze u staklenoj čaši pomoću staklenog štapića za miješanje ([2]). Iz sigurnosnih razloga miješanje treba vršiti na način da između vršitelja pokusa i mješavine postoji sigurnosni štit. Ako se mješavina zapali tijekom miješanja ili punjenja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Mješavina se u tlačnu posudu dodaje u malim količinama laganim tapkanjem kako bi se mješavina dobro sabila oko svitka za paljenje i bila u dobrom dodiru s njim. Važno je da se tijekom postupka sabijanja elektroda ne izvije jer to može dovesti do pogrešnih rezultata ([3]). Rasprskavajuća ploča i vijak koji je drži čvrsto se stegnu. Napunjena posuda prenese se u potporni stalak za paljenje, s tim da je rasprskavajuća ploča u krajnjem gornjem položaju, koji treba biti smješten u odgovarajući obloženi digestor ili ćeliju za paljenje. Izvor napajanja priključi se na vanjske stezaljke mehanizma za paljenje i pusti se struja jačine 10 A. Vrijeme između početka miješanja i uključivanja napajanja ne bi smjelo biti duže od 10 minuta.

Signal koji proizvodi pretvornik tlaka bilježi se u odgovarajućem sustavu koji omogućuje i procjenu i trajnu evidenciju kretanja tlaka u vremenu (npr. zapisivač prijenosa spojen na uređaj za ispisivanje krivulje). Mješavina se zagrijava sve dok se rasprskavajuća ploča ne rasprsne ili do isteka najmanje 60 s. Ako se rasprskavajuća ploča ne rasprsne, mješavinu treba ostaviti da se ohladi prije nego se uređaj oprezno rastavi, uz mjere opreza i vodeći računa o eventualnoj pojavi tlaka. S ispitivanom tvari i jednom ili više referentnih tvari provodi se pet pokusa. Bilježi se vrijeme koje je potrebno da tlak poraste od 690 kPa do 2 070 kPa iznad atmosferskog. Izračunava se srednje vrijeme porasta tlaka.

U nekim slučajevima, tvari mogu proizvesti porast tlaka (prevelik ili premali) uslijed kemijskih reakcija koje nisu karakteristične za oksidativna svojstva tvari. U takvim slučajevima možda će trebati ponoviti ispitivanje s inertnom tvari, npr. dijatomejskom zemljom, umjesto celuloze kako bi se razjasnila priroda reakcije.

([1]) Mješavine oksidansa s celulozom treba tretirati kao potencijalno eksplozivne i njima rukovati s dužnom pažnjom.

([2]) U praksi se to postiže miješanjem mješavine 1:1 tekućine koja se ispituje i celuloze u količini većoj od potrebne za pokus i prijenos 5 ± 0,1 g do tlačne posude. Mješavinu treba pripremiti svježu za svaki pokus.

([3]) Posebno, treba izbjegavati dodir između susjednih okretaja svitka.

▼B

2. **PODACI**

Vremena porasta tlaka i kod ispitivane tvari i kod jedne ili više referentnih tvari. Vremena porasta tlaka za ispitivanja s inertnim tvarima, ako su provedena.

2.1. OBRADA REZULTATA

Izračunavaju se srednja vremena porasta tlaka i za ispitivanu tvar i za jednu ili više referentnih tvari.

Izračunava se srednje vrijeme porasta tlaka za ispitivanja s inertnim tvarima (ako su provedena).

Neki primjeri rezultata prikazani su u tablici 1.

Tablica 1.

Primjeri rezultata [a]

Tvar [b]	Srednje vrijeme porasta tlaka za mješavinu celuloze 1:1 (ms)
Amonijev dikromat, zasićena vodena otopina	20 800
Kalcijev nitrat, zasićena vodena otopina	6 700
Željezov nitrat, zasićena vodena otopina	4 133
Litijev perklorat, zasićena vodena otopina	1 686
Magnezijev perklorat, zasićena vodena otopina	777
Niklov nitrat, zasićena vodena otopina	6 250
Nitratna kiselina, 65 %	4 767 [c]
Perklorna kiselina, 50 %	121 [c]
Perklorna kiselina, 55 %	59
Kalijev nitrat, 30 % vodena otopina	26 690
Srebrov nitrat, zasićena vodena otopina	[d]
Natrijev klorat, 40 % vodena otopina	2 555 [c]
Kalijev nitrat, 45 % vodena otopina	4 133
Inertna tvar	
Voda, celuloza	[d]

[a] Vidjeti referencu (1) za klasifikaciju prema UN-ovom sustavu prijevoza.
[b] Zasićene otopine treba pripremati na 20 °C.
[c] Srednja vrijednost iz međulaboratorijskih usporednih pokusa.
[d] Maksimalni tlak od 2 070 kPa nije dostignut.

▼B

3. **IZVJEŠĆE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju treba, ako je moguće, navesti sljedeće informacije:

— identitet, sastav, čistoća itd. ispitivane tvari,

— koncentracija ispitivane tvari,

— primijenjeni postupak sušenja celuloze,

— sadržaj vode u celulozi koja je korištena,

— rezultati mjerenja,

— rezultati ispitivanja s inertnom tvari, ako su provedena,

— izračunana srednja vremena porasta tlaka,

— eventualna odstupanja od ove metode i razloge za njih,

— sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

3.2. TUMAČENJE REZULTATA ([1])

Rezultati ispitivanja procjenjuju se na temelju:

(a) činjenice je li se mješavina ispitivane tvari i celuloze spontano zapalila; i

(b) uspoređivanja srednjeg vremena koje je potrebno da tlak poraste s 690 kPa na 2 070 kPa i srednjeg vremena jedne ili više referentnih tvari.

Tekuća tvar smatra se oksidansom ako:

(a) se mješavina u omjeru 1:1 težinskog udjela tvari i celuloze spontano zapali; ili

(b) mješavina tvari i celuloze u omjeru 1:1 masenog udjela tvari i celuloze pokazuje srednje vrijeme porasta temperature koje je manje od ili jednako srednjem vremenu porasta temperature mješavine 1:1 masenog udjela 65 % (m/m) vodene nitratne kiseline i celuloze.

Kako bi se izbjegli lažni pozitivni rezultati, prilikom tumačenja rezultata po potrebi isto tako treba uzeti u obzir rezultate dobivene kod ispitivanja tvari s inertnim materijalom.

([1]) Vidjeti referencu 1. za tumačenje rezultata prema UN-ovim propisima za prijevoz u kojima se primjenjuje nekoliko referentnih tvari.

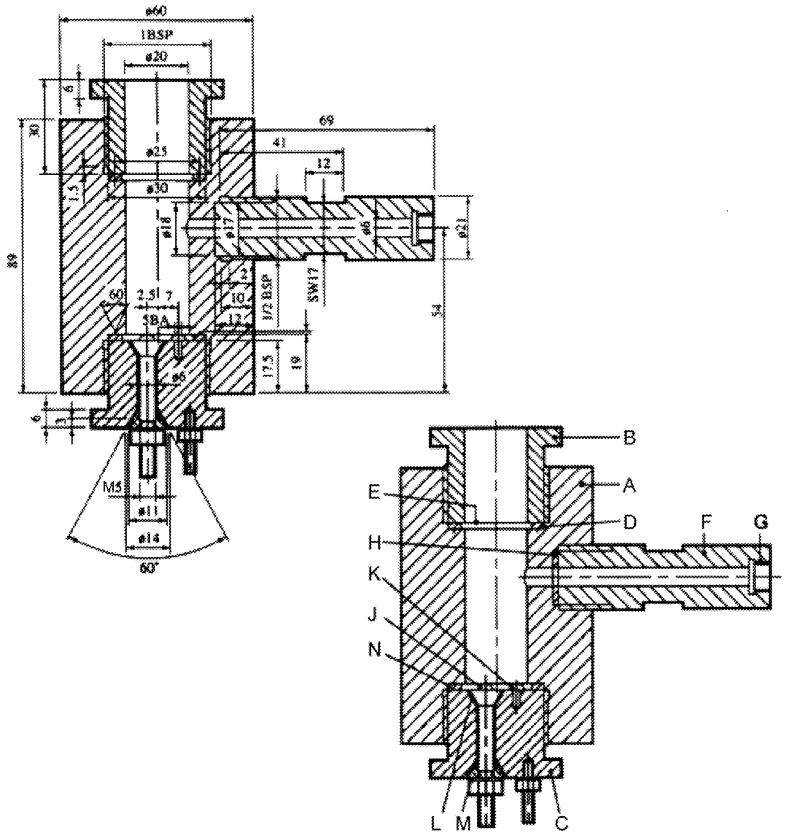
▼B

4. **REFERENCE**

(1) Recommandations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, str. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

Slika 1

Tlačna posuda



(A) Kućište tlačne posude

(B) Nosač rasprskavajuće ploče

(C) Mehanizam za paljenje

(D) Podloška od mekog olova

(E) Rasprskavajuća ploča

(F) Bočni rukavac

(G) Glava pretvornika tlaka

(H) Podloška

(J) Izolirana elektroda

(K) Uzemljena elektroda

(L) Izolacija

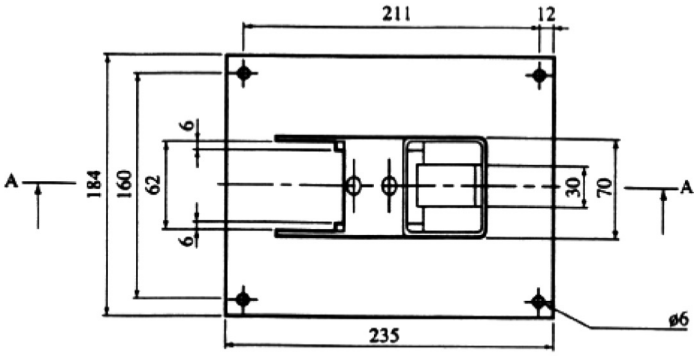
(M) Čelični konus

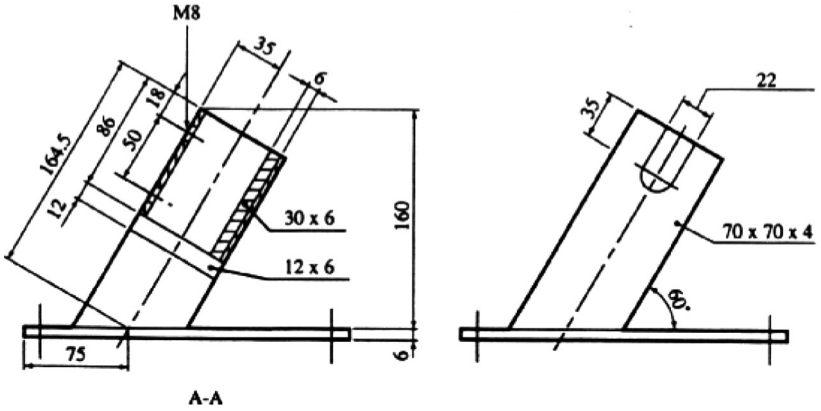
(N) Utor za podlošku

▼B

Slika 2.

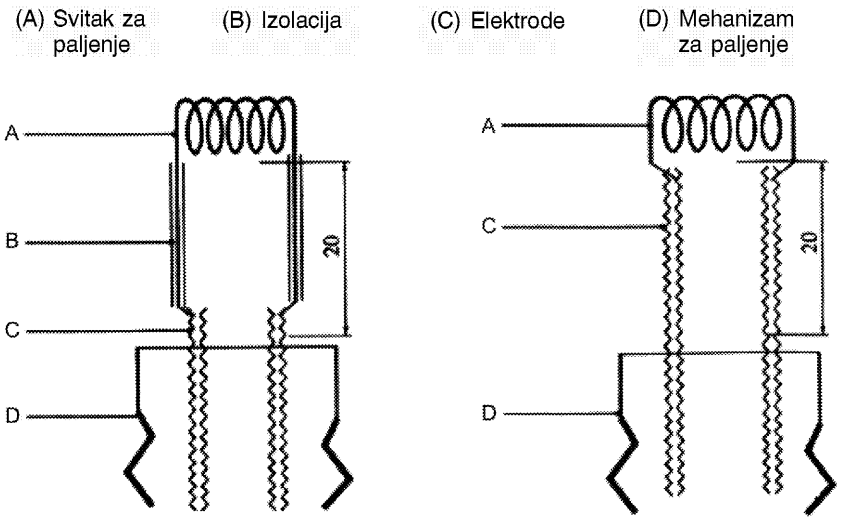
Nosivi stalak





Slika 3.

Sustav paljenja



Napomena: može se koristiti bilo koja od ovih konfiguracija.

▼M1

A.22. ODREĐIVANJE SREDNJEGA GEOMETRIJSKOG PROMJERA VLAKANA POMOĆU DULJINE

1. METODA

1.1. UVOD

U ovoj se metodi opisuje postupak za mjerenje srednjeg geometrijskog promjera pomocu duljine (LWGMD – Length Weighted Geometric Mean Diameter) umjetnih mineralnih vlakana (MMMF – Man-Made Mineral Fibres). Buduci da se LWGMD vlakana s 95 % vjerojatnosti nalazi izmedu razina pouzdanosti uzorka od 95 % (tj. LWGMD ± dvije standardne greške), vrijednost koja se navodi u izvješcu (ispitna vrijednost) odgovarat ce donjoj granici pouzdanosti uzorka od 95 % (tj. LWGMD – 2 standardne greške). Metoda se temelji na ažuriranoj verziji (lipanj 1994.) nacrta industrijskog postupka za zaštitu zdravlja, sigurnost i zaštitu okoliša (HSE) koji je dogovoren na sastanku izmedu ECFIA-a i HSE-a u Chesteru 26.9.1993. i koji je izraden za potrebe drugog medulaboratorijskog pokusa i na temelju tog pokusa (1., 2.). Ova mjerna metoda može se koristiti za opisivanje promjera vlakana materijala u rasutom stanju i proizvoda koji sadrže MMMF, ukljucujuci vatrostalna keramicka vlakna (RCF – Refractory Ceramic Fibres), umjetna staklena vlakna (MMVF – Man-Made Vitreous Fibres), kristalna i polikristalna vlakna.

Odredivanje duljinom je nacin da se kompenzira utjecaj na razdiobu promjera zbog pucanja dugackih vlakana do kojega dolazi prilikom uzorkovanja i rukovanja materijalom. Za mjerenje razdiobe velicina promjera MMMF koristi se geometrijska statistika (geometrijska sredina) buduci da se njihove razdiobe velicina obicno približavaju log-normalnoj razdiobi.

Mjerenje duljine i promjera je zamoran i dugotrajan posao, ali ako se mjere samo vlakna koja dodiruju beskonacno tanku crtu u vidnom polju SEM-a, tada je vjerojatnost da se odabere odredeno vlakno razmjerna duljini. Buduci da je pitanje duljine za potrebe odredivanja duljinom time riješeno, potrebno je samo izmjeriti promjer i LWGMD-2SE se tada može izracunati na nacin kako je opisano.

1.2. DEFINICIJE

Cestica: Predmet ciji je omjer duljine i širine manji od 3:1.

Vlakno: Predmet ciji je omjer duljine i širine (razmjer stranica) najmanje 3:1.

1.3. PODRUCJE PRIMJENE I OGRANICENJA

Metoda je namijenjena proucavanju razdioba promjera kod srednjih promjera od 0,5 μm do 6 μm. Veci se promjeri mogu mjeriti uz primjenu manjih SEM povecanja, ali se time povecavaju ogranicenja metode kod finijih razdioba vlakana, dok se u slucaju srednjih promjera ispod 0,5 μm preporucuje mjerenje uz pomoc TEM (transmisijski elektronski mikroskop) mikroskopa.

▼M1

1.4. NACELO ISPITNE METODE

Uzme se odredeni broj reprezentativnih uzoraka iz jezgre mekane ploce ili slobodnih vlakana u rasutom stanju. Vlakna u rasutom stanju se skrate drobljenjem i reprezentativni poduzorak dispergira u vodi. Zatim se vade alikvoti i filtriraju kroz polikarbonatni filtar velicine pora 0,2 μm i pripreme za pregled pod skenirajucim elektronskim mikroskopom (SEM). Promjeri vlakana mjere se pod povecanjem × 10 000 ili vecim ([1]) metodom presijecanja linija da bi se dobila nepristrana procjena srednjeg promjera. Izracuna se donji interval pouzdanosti 95 % (na temelju jednostranog testa) tako da se dobije procjena najniže vrijednosti srednjega geometrijskog promjera vlakana materijala.

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Sigurnost/mjere opreza**

Izlaganje ljudi lebdecim vlaknima treba svesti na najmanju mogucu mjeru te kod rukovanja suhim vlaknima koristiti digestor ili komoru za rukovanje s rukavicama („glove box”). Izloženost ljudi treba periodicki provjeravati kako bi se utvrdila ucinkovitost zaštitnih mjera. Kod rukovanja MMMF vlaknima treba nositi rukavice za jednokratnu uporabu kako bi se umanjilo nadraživanje kože i sprijecila križna kontaminacija.

1.5.2. **Aparatura/oprema**

— Preša i kalupi (10 MPa),

— Polikarbonatni filtri s kapilarnim porama velicine pora 0,2 μm (promjer 25 mm),

— Membranski filtar od celuloznog estera velicine pora 5 μm, koji se koristi kao pomocni filtar,

— Stakleni uredaj za filtraciju (ili filtracijski sustavi za jednokratnu uporabu) za filtre promjera 25 mm (npr. stakleni komplet za mikroanalizu Milipore, tip XX10 025 00),

— Svježe destilirana voda, filtrirana kroz filtar velicine pora 0,2 μm radi uklanjanja mikroorganizama,

— Uredaj za naparivanje zlata ili zlata/paladija,

— Skenirajuci mikroskop razlucivosti do 10 nm i povecanjem × 10 000,

— Razno: spatule, skalpelski nož tip 24, pinceta, SEM cjevcice, karbonsko ljepilo ili karbonska ljepljiva traka, koloidno srebro („silver dag”),

— Ultrazvucna sonda ili stolna ultrazvucna kupelj,

— Svrdlo za uzorkovanje jezgre ili svrdlo za pluto za uzimanje uzoraka iz MMMF ploca.

([1]) Ova vrijednost povecanja odnosi se na vlakna od 3 μm, za vlakna od 6 μm možda je primjerenije koristiti povecanje × 5 000.

▼**M1**

1.5.3. **Ispitni postupak**

1.5.3.1. *Uzorkovanje*

Za uzimanje uzoraka iz presjeka tvrdih ili mekanih vlaknastih ploca koristi se svrdlo za uzorkovanje jezgre ili svrdlo za pluto od 25 mm. Uzorci se uzimaju u jednolikim razmacima po širini ploce, ako se radi o plocama male duljine, ili nasumicno, ako su raspoložive velike ploce. Ista se oprema može koristiti i za ekstrahiranje slucajnih uzoraka slobodnih vlakana. Po mogucnosti treba uzeti šest uzoraka kako bi se uzele u obzir prostorne varijacije unutar materijala.

Šest jezgrovanih uzoraka zdrobi se u kalupu promjera 50 mm pod tlakom od 10 MPa. Materijal se promiješa spatulom i ponovno stlaci na 10 MPa. Materijal se zatim izvadi iz kalupa i pohrani u cvrsto zatvorenoj staklenoj boci.

1.5.3.2. *Priprema uzorka*

Prema potrebi, vlakno treba ostaviti oko sat vremena u peci na temperaturi od 450 °C da bi se uklonilo organsko vezivo.

Uzorak se podijeli na poduzorke postupkom cetvorenja stošca („cone and quarter”) (to treba uciniti u komori za zaštitu od prašine).

Mala se kolicina uzorka (< 0,5 g) spatulom doda u 100 ml svježe destilirane vode koja je profiltrirana kroz membranski filtar od 0,2 μm (mogu se koristiti i drugi izvori ultraciste vode ako se dokaže da su zadovoljavajuce kakvoce). Uzorak se dobro rasprši uz pomoc ultrazvucne sonde snage 100 W koja je ugodena tako da izazove kavitaciju. (Ako sonda nije raspoloživa, koristi se sljedeci postupak: uzorak protresti i okrenuti, ponavljajuci postupak 30 sekundi – petminutna obrada u stolnoj ultrazvucnoj kupelji – još 30 sekundi protresati i okretati.)

Cim se vlakno dispergira, izvadi se odredeni broj alikvota (npr. tri alikvota od 3, 6 i 10 ml) pipetom širokoga grla (zapremine 2 – 5 ml).

Svaki se alikvot filtrira pod vakuumom kroz polikarbonatni filtar 0,2 μm i pomocni MEC filtar velicine pora 5 μm, koristeci stakleni filtar-lijevak s cilindricnim spremnikom. U lijevak se ulije oko 5 ml filtrirane destilirane vode i alikvot polako pipetira u vodu držeci vrh pipete ispod meniskusa. Pipetu i spremnik treba temeljito isprati nakon pipetiranja jer se tanka vlakna znaju nakupljati na površini.

Filtar se oprezno ukloni i odvoji od pomocnog filtra te stavi u posudu da se osuši.

▼M1

Ljuljajucim pokretima odreže se jedna cetvrtina ili jedna polovina dijela filtra s filtarskim talogom koristeci skalpel tipa 24. Odrezani se dio pažljivo pricvrsti na SEM nosac („stub”) pomocu karbonske ljepljive trake ili karbonskog ljepila. Koloidno srebro treba nanijeti na najmanje tri mjesta kako bi se poboljšao elektricni kontakt na rubovima filtra i nosaca. Kad se ljepilo/koloidno srebro osuši, na površinu taloga se naparivanjem nanese cca 50 nm zlata ili zlato/paladija.

1.5.3.3. *Kalibracija i rad SEM-a*

1.5.3.3.1. K a l i b r a c i j a

Kalibraciju SEM-a treba provjeriti najmanje jedanput tjedno (u idealnom slucaju jedanput dnevno) pomocu ovjerene rešetke za kalibraciju. Kalibracija se provjerava u odnosu na odobreni standard; ako izmjerena vrijednost (SEM) nije u granicama ± 2 % odobrene vrijednosti, kalibraciju treba prilagoditi i ponovno provjeriti.

Na stvarnom matriksu uzorka, SEM mora imati mogucnost razlucivanja barem minimalnog vidljivog promjera od 0,2 μm pri povecanju × 2 000.

1.5.3.3.2. R a d

SEM treba podesiti na povecanje od 10 000 ([1]) i osigurati uvjete koji daju dobru razlucivost i prihvatljivu kakvocu slike pri malim brzinama skeniranja, npr. 5 sekundi po slicici. Iako razliciti uredaji mogu imati razlicite radne postavke, za najbolju vidljivost i razlucivost kod rada s materijalima relativno niske atomske mase uglavnom treba koristiti ubrzavajuci napon od 5 – 10 keV i uredaj podesiti na malu velicinu tocke i kratku radnu udaljenost. Kad se provodi linearna traverza, treba koristiti nagib od 0° da bi se smanjila potreba za ponovnim fokusiranjem, a ako SEM ima eucentricnu fazu, treba koristiti eucentricnu radnu udaljenost. Može se koristiti i manje povecanje ako materijal ne sadrži mala vlakna (malog promjera) i promjeri vlakana su veliki (> 5 μm).

1.5.3.4. *Odredivanje velicine*

1.5.3.4.1. O c j e n j i v a n j e u z o r k a p r e g l e d o m p o d m a l i m p o v e c a n j e m

Na pocetku uzorak treba pregledati pod malim povecanjem da bi se otkrile eventualne naznake stvaranja grudica velikih vlakana i procijenila gustoca vlakana. U slucaju pretjeranog broja grudica, preporucljivo je pripremiti novi uzorak.

Da bi se postigla statisticka tocnost, potrebno je izmjeriti odredeni minimalni broj vlakana – velika gustoca vlakana može se smatrati poželjnom osobinom jer pregledavanje praznih polja oduzima vrijeme, a ne daje nikakav doprinos analizi. Medutim, ako je filtar preopterecen, bit ce teško izmjeriti sva mjerljiva vlakna, a neka se manja vlakna mogu i previdjeti ako su sakrivena iza velikih vlakana.

([1]) Za vlakna od 3 μm, vidi prethodnu napomenu.

▼M1

Ako je gustoca vlakana iznad 150 vlakana po milimetru linearne traverze, može se javiti pristranost u smislu previsoke procjene LWGMD. S druge strane, male koncentracije vlakana produžuju vrijeme analize i cesto je isplativije pripremiti uzorak cija je gustoca vlakana bliža optimalnoj gustoci nego nastaviti s brojenjem na filtrima s niskom koncentracijom. Kod optimalne gustoce vlakana treba prosjecno dobiti otprilike jedno do dva brojiva vlakna po vidnom polju pri povecanju od 5 000. Ipak, optimalna gustoca ovisi o velicini (promjeru) vlakana; stoga se ispitivac u odredenoj mjeri mora osloniti na vlastitu strucnu prosudbu kako bi odlucio je li gustoca vlakana približno optimalna ili nije.

1.5.3.4.2. Odredivanje promjera vlakana duljinom

Broje se samo vlakna koja dodiruju (ili sijeku) (beskonacno) tanku crtu na zaslonu SEM-a. Stoga treba povuci vodoravnu (ili okomitu) crtu kroz sredinu zaslona.

Druga je mogucnost da se u sredinu zaslona stavi samo tocka i zapocne kontinuirano skeniranje u jednom smjeru preko filtra. Mjeri se i bilježi promjer svakog vlakna razmjera stranica veceg od 3:1 koje dodiruje ili sijece tu tocku.

1.5.3.4.3. Odredivanje velicine vlakna

Preporucuje se da se izmjeri najmanje 300 vlakana. Svako se vlakno mjeri samo jedanput u tocki gdje sijece crtu ili tocku nacrtanu na slici (ili u blizini sjecišta ako su rubovi vlakna skriveni). Ako se naide na vlakna neujednacenog presjeka, uzima se u obzir mjerenje koje predstavlja prosjecni promjer vlakna. Definiranje ruba i mjerenje najkrace udaljenosti izmedu rubova vlakna zahtijeva poseban oprez. Odredivanje velicine može se provoditi izravno „on line” ili „off-line” na pohranjenim slikama odnosno fotografijama. Preporucuju se poluautomatski sustavi mjerenja slike koji podatke izravno ucitavaju u tablicu, jer se tako štedi vrijeme i izbjegavaju greške u prijepisu, a izracun se može automatizirati.

Krajeve dugackih vlakana treba pregledati pod malim povecanjem da bi se provjerilo da ne zavijaju natrag u vidno polje mjerenja i da ne bi bili izmjereni više puta.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Promjeri vlakana uglavnom nemaju normalnu razdiobu. Ipak, logaritamskom transformacijom može se dobiti približno normalna razdioba.

Izracuna se aritmeticka sredina (srednji lnD) i standardna devijacija (SD_{lnD}) vrijednosti logaritma po bazi e (lnD) n promjera vlakana (D).

$$\text{sred. } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1.)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - sred\ lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardna se devijacija podijeli kvadratnim korijenom broja mjerenja (n) da bi se dobila standardna greška (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Da bi se dobila geometrijska sredina umanjena za dvije geometrijske standardne greške, dvostruka standardna greška oduzme se od srednje vrijednosti i izracuna eksponent te vrijednosti (srednja vrijednost minus dvije standardne greške).

$$LWGMD - 2SE = e^{(sred\ lnD\ -\ 2SE_{lnd})} \quad (4.)$$

3. **IZVJEŠCIVANJE**

IZVJEŠCE O ISPITIVANJU

Izvješce o ispitivanju sadrži barem ove informacije:

— vrijednost LWGMD-2SE,

— sva odstupanja, a posebno ona koja imaju utjecaja na preciznost ili tocnost rezultata, uz odgovarajuca obrazloženja.

4. **LITERATURA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive, February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive, Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

A.23 KOEFICIJENT RAZDJELJENJA (1-OKTANOL/VODA): METODA SPOROG MIJEŠANJA

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 123 (2006.). Vrijednosti koeficijenta razdjeljenja 1-oktanol/voda (P_{OW}) do log P_{OW} od 8,2 pažljivo se određuju metodom sporog miješanja (1). Stoga je to prikladan pokusni pristup za izravno određivanje vrijednosti P_{OW} jako hidrofobnih tvari.

2. Ostale metode za određivanje koeficijenta razdjeljenja 1-oktanol/voda (P_{OW}) jesu metoda „protresanjem u tikvici" (2) i određivanje P_{OW} iz obrnute faze ponašanja pri retenciji kod visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC) (3). Metoda „protresanjem u tikvici" sklona je stvaranju artefakata zbog transfera mikro-kapljica oktanola u vodenoj fazi. S porastom vrijednosti P_{OW} prisutnost tih kapljica u vodenoj fazi dovodi do povećanja previsokih procjena koncentracije ispitivane tvari u vodi. Stoga je njezina primjena ograničena na tvari kod kojih je log $P_{OW} < 4$. Druga metoda počiva na pouzdanim podacima o izravno određenoj vrijednosti P_{OW} kako bi se odredio odnos između ponašanja pri zadržavanju kod HPLC-a i izmjerenih vrijednosti P_{OW}. Prijedlog smjernice OECD-a bio je dostupan za određivanje koeficijenta razdjeljenja 1-oktanol/voda ionizirajućih tvari (4), ali se više neće koristiti.

3. Ova ispitna metoda razvijena je u Nizozemskoj. Preciznost ovdje opisanih metoda potvrđena je i optimizirana u validacijskoj studiji o prstenastim testovima u kojoj je sudjelovalo 15 laboratorija (5).

UVODNA RAZMATRANJA

Značenje i primjena

4. Za inertne organske tvari utvrđeni su veoma značajni odnosi između koeficijenta razdjeljenja 1-oktanol/voda (P_{OW}) i njihove bioakumulacije u ribama. Štoviše, pokazalo se da je P_{OW} u korelaciji s toksičnošću za ribe kao i sa sorpcijom kemikalija u krute tvari, poput tala i sedimenata. Opsežan pregled tih odnosa naveden je u referenci (6).

5. Utvrđene su razne vrste odnosa između koeficijenta razdjeljenja 1-oktanol/voda i drugih svojstava tvari relevantnih za toksičnost u okolišu i kemiju. Kao posljedica toga, koeficijent razdjeljenja 1-oktanol/voda razvio se u ključni parametar u procjeni opasnosti kemikalija po okoliš, kao i u predviđanju sudbine kemikalija u okolišu.

Područje primjene

6. Pokus sa sporim miješanjem zamišljen je kako bi se smanjilo stvaranje mikro-kapljica iz kapljica 1-oktanola u vodenoj fazi. Kao posljedica toga, nema previsoke procjene koncentracije u vodenoj otopini zbog molekula ispitivane tvari povezanih s tim kapljicama. Stoga je metoda sporog miješanja posebno prikladna za određivanje P_{OW} za tvari očekivanih log P_{OW} vrijednosti od 5 i većih, za koje se metodom protresanja tikvice (2) često dobivaju pogrešni rezultati.

▼M4

DEFINICIJA I JEDINICE

7. Koeficijent razdjeljenja tvari između vode i lipofilnog otapala (1-oktanola) karakterizira uravnoteženu raspodjelu kemikalije između dviju faza. Koeficijent razdjeljenja između vode i 1-oktanola (P_{OW}) definira se kao omjer uravnoteženih koncentracija ispitivane tvari u 1-oktanolu zasićenom vodom (C_O) i vodi zasićenoj 1-oktanolom (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Budući da je riječ o omjeru koncentracija, koeficijent razdjeljenja nema dimenzija. Najčešće se navodi kao logaritam s bazom 10 ($\log P_{OW}$). P_{OW} ovisi o temperaturi, a podaci iz izvješća trebaju uključivati temperaturu mjerenja.

NAČELO METODE

8. Kako bi se odredio koeficijent razdjeljenja, voda, 1-oktanol i ispitivana tvar uravnotežuju se jedni s drugima na konstantnoj temperaturi. Zatim se određuju koncentracije ispitivane tvari u dvjema fazama.

9. Poteškoće u pokusu povezane s nastankom mikro-kapljica tijekom pokusa s protresanjem u tikvici mogu se smanjiti u (ovdje) predloženom pokusu sa sporim miješanjem. U pokusu sa sporim miješanjem voda, 1-oktanol i ispitivana tvar uravnotežuju se u termostatiranom reaktoru za miješanje. Izmjena faza ubrzava se miješanjem. Miješanje uvodi ograničenu turbulenciju koja pospješuje razmjenu između 1-oktanola i vode bez stvaranja mikro-kapljica (1).

PRIMJENJIVOST TESTA

10. Budući da bi prisutnost drugih tvari osim ispitivane tvari mogla utjecati na koeficijent aktivnosti ispitivane tvari, ispitivanu tvar treba ispitivati kao čistu tvar. Za pokus s razdjeljivanjem 1-oktanol/vode treba upotrijebiti najviši stupanj čistoće koji se može nabaviti.

11. Ova se metoda primjenjuje na čiste tvari koje se ne disociraju ili asociraju i koje ne pokazuju značajnu interfacijalnu aktivnost. Može se primijeniti za određivanje omjera razdjeljenja 1-oktanol/vode takvih tvari i smjesa. Ako se metoda primjenjuje za smjese, određeni omjeri razdjeljenja 1-oktanol/vode uvjetovani su i ovise o kemijskom sastavu ispitivane smjese te o sastavu elektrolita upotrijebljenih kao vodena faza. Ako se poduzmu dodatni koraci, metoda se također može primijeniti za disocijativne ili asocijativne spojeve (stavak 12).

12. Zbog višestrukog uravnoteženja vode i 1-oktanola u razdjeljenju 1-oktanol/vode disocijativnih tvari, kao što su organske kiseline i fenoli, organske lužine i organometalne tvari, omjer razdjeljenja 1-oktanol/vode uvjetovana je konstanta koja snažno ovisi o sastavu elektrolita (7)(8). Stoga je za određivanje omjera razdjeljenja 1-oktanol/vode nužno da se tijekom pokusa kontrolira pH vrijednost i sastav elektrolita te da se unesu u izvješće. Za ocjenu tih omjera razdjeljenja valja pribaviti stručno mišljenje. Uz primjenu vrijednosti konstante/i disocijacije treba odabrati prikladne pH vrijednosti, takve da se za svako stanje ionizacije odredi omjer razdjeljenja. Kada se ispituju organometalni spojevi (8), trebaju se upotrebljavati nekompleksirajući puferi. Uzimajući u obzir postojeće znanje o kemiji voda (konstante kompleksacije, konstante disocijacije), uvjeti pokusa trebaju se odabrati tako da se može procijeniti specijacija ispitivane tvari u vodenoj fazi. Ionska jakost morala bi biti jednaka u svim pokusima zbog primjene pozadinskog elektrolita.

▼M4

13. Poteškoće u ispitivanju mogu se pojaviti u provođenju ispitivanja tvari niske topljivosti u vodi ili visokog P_{OW} zbog činjenice da su koncentracije u vodi postale toliko niske da ih je teško precizno odrediti. Ova ispitna metoda pruža upute o rješavanju tog problema.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

14. Kemijski reagensi trebali bi biti čistoće analitičkog stupnja ili veće. Preporuča se primjena neoznačenih ispitivanih tvari poznatog kemijskog sastava i po mogućnosti čistoće od najmanje 99 % ili radioaktivno označenih ispitivanih tvari poznatog kemijskog sastava i radio-kemijske čistoće. U slučaju obilježivača s kratkim vremenom poluraspada valja primijeniti korekcije za raspadanje. U slučaju radioaktivno označenih ispitivanih tvari valja primijeniti analitičku metodu specifičnu za tu kemikaliju kako bi se osiguralo da je izmjerena radioaktivnost izravno povezana s ispitivanom tvari.

15. Procijenjeni log P_{OW} može se dobiti primjenom komercijalno dostupnog softvera za procjenu log P_{OW} ili primjenom omjera topljivosti u oba otapala.

16. Prije provođenja pokusa sa sporim miješanjem za određivanje P_{OW} dostupne trebaju biti sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) strukturna formula;

(b) prikladne analitičke metode određivanja koncentracije tvari u vodi i 1-oktanolu;

(c) konstanta/e disocijacije ionizirajućih tvari (Smjernica OECD-a 112 (9));

(d) topljivost u vodenoj otopini (10);

(e) abiotička hidroliza (11);

(f) laka biorazgradivost (12);

(g) tlak pare (13).

OPIS METODE

Oprema i aparatura

17. Potrebna je standardna laboratorijska oprema, a posebno sljedeći pribor:

— za miješanje vodene faze koriste se magnetne miješalice i magnetni štapići za miješanje premazani teflonom,

— analitički instrumenti prikladni za određivanje koncentracije ispitivane tvari u slučaju očekivanih koncentracija,

— posuda za miješanje sa slavinom na dnu. Ovisno o procijenjenom log P_{OW} i granici detekcije (LOD) ispitivanog spoja u obzir valja uzeti primjenu reakcijske posude jednake geometrije, veće od jedne litre kako bi se dobio dovoljan volumen vode za kemijsku ekstrakciju i analizu. To će rezultirati višim koncentracijama u vodenom ekstraktu te tako pouzdanijim analitičkim određivanjem. Tablica s procjenama minimalnog potrebnog volumena, LOD-a spoja, njegova procijenjenog log P_{OW} i njegove topljivosti u vodi nalazi se u Dodatku 1. Tablica se temelji na odnosu log P_{OW} i omjera topljivosti u oktanolu i vodi, kao što su pokazali Pinsuwan i sur. (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

gdje je

$SR = S_{oct}/S_w$ (u molaritetu),

te odnos koji navodi Lyman (15) za predviđanje topljivosti u vodi. Vrijednosti topljivosti u vodi izračunate jednadžbom iz Dodatka 1. trebaju se smatrati prvom procjenom. Valja primijetiti da korisnik može izraditi procjenu topljivosti u vodi pomoću svih odnosa za koje smatra da bolje predstavljaju odnos između hidrofobnosti i topljivosti. Za krute spojeve preporučuje se, primjerice, uključivanje tališta u predviđanje topljivosti. U slučaju primjene izmijenjene jednadžbe valja osigurati da je jednadžba za izračun topljivosti u oktanolu još uvijek valjana. Shematski prikaz posude za miješanje obložene staklom volumena od oko jedne litre nalazi se u Dodatku 2. Proporcije posude prikazane u Dodatku 2. pokazale su se povoljnima i valja ih se pridržavati u slučaju primjene aparature drukčije veličine;

— ključno je sredstvo za održavanje temperature konstantnom tijekom pokusa sa sporim miješanjem.

18. Posude moraju biti izrađene od takvog inertnog materijala da adsorpcija na površinu posude bude zanemariva.

Priprema ispitnih otopina

19. Određivanje P_{OW} valja provesti s 1-oktanolom najviše čistoće koja se komercijalno može nabaviti (najmanje + 99 %). Preporučuje se pročišćavanje 1-oktanola ekstrakcijom kiselinom, lužinom i vodom te sušenjem nakon toga. Uz to se 1-oktanol može pročistiti i destilacijom. Pročišćeni 1-oktanol treba upotrijebiti za pripremu standardnih otopina ispitivanih tvari. Voda za uporabu pri određivanju P_{OW} treba biti destilirana u aparaturi od stakla ili kvarca ili dobivena sustavom pročišćavanja, a može se upotrijebiti i voda stupnja čistoće HPLC. Za destiliranu vodu potrebna je filtracija kroz filtar od 0,22 μm, a treba uključiti i slijepe probe kako bi se provjerilo da u koncentriranim ekstraktima koji mogu utjecati na ispitivanu tvar nema nečistoća. U slučaju primjene filtra od staklenih vlakana, filtar treba čistiti pečenjem najmanje tri sata na 400 °C.

20. Oba se otapala prije pokusa uzajamno zasićuju uravnoteženjem u posudi dovoljne veličine. To se obavlja tijekom dva dana pomoću dvofaznog sustava za sporo miješanje.

21. Odabire se prikladna koncentracija ispitivane tvari i otapa se u 1-oktanolu (zasićenom vodom). Koeficijent razdjeljenja 1-oktanol/vode valja odrediti u razrijeđenim otopinama 1-oktanola i vode. Stoga koncentracija ispitivane tvari ne bi smjela premašiti 70 % njezine topljivosti s maksimalnom koncentracijom od 0,1 M u bilo kojoj fazi (1). Otopine 1-oktanola upotrijebljene u pokusu ne smiju sadržavati otopljene krutine ispitivane tvari.

22. Prikladna količina ispitivane tvari otapa se u 1-oktanolu (zasićenom vodom). Ako procijenjeni log P_{OW} premaši pet, treba se pobrinuti da otopine 1-oktanola upotrijebljene za pokus ne sadržavaju otopljene krutine ispitivane tvari. S tim ciljem primjenjuje se sljedeći postupak za kemikalije čija je procijenjena vrijednost log $P_{OW} > 5$:

— ispitivana tvar otapa se u 1-oktanolu (zasićenom vodom),

▼M4

— otopini se ostavi dovoljno vremena da se otopljena kruta tvar istaloži. Tijekom razdoblja taloženja nadzire se koncentracija ispitivane tvari,

— kada izmjerene koncentracije otopine 1-oktanola postignu stabilne vrijednosti, radna otopina razrjeđuje se odgovarajućim volumenom 1-oktanola,

— mjeri se koncentracija razrijeđene radne otopine. Ako se izmjerena koncentracija podudara s razrjeđenjem, razrijeđena radna otopina može se upotrijebiti u pokusu sa sporim miješanjem.

Uzimanje i analiza uzoraka

23. Za analizu ispitivane tvari treba upotrijebiti provjerenu analitičku metodu. Istraživači moraju pružiti dokaz da su koncentracije u 1-oktanolu zasićenom vodom kao i u vodenoj fazi zasićenoj 1-oktanolom tijekom pokusa veće od granice kvantifikacije korištenih analitičkih postupaka u toj metodi. U slučajevima u kojima su potrebne metode ekstrakcije prije pokusa potrebno je uspostaviti analitičke rekuperacije ispitivane tvari iz vodene faze i faze 1-oktanola. Analitičke signale treba korigirati slijepim probama i treba se pobrinuti da se ne dogodi prenošenje analizirane tvari iz jednog uzorka u drugi.

24. Vjerojatno će prije analize biti potrebna ekstrakcija u vodenoj fazi organskim otapalom i prethodnom koncentracijom ekstrakta zbog relativno niskih koncentracija hidrofobnih ispitivanih tvari u vodenoj fazi. Iz istog razloga potrebno je smanjiti eventualne koncentracije u slijepim probama. Stoga je nužno upotrebljavati otapala visoke čistoće, po mogućnosti otapala za analizu ostataka. Štoviše, rad sa staklenom opremom koja je prethodno pažljivo očišćena(npr. pranjem otapalom ili pečenjem na povišenoj temperaturi) može pomoći pri izbjegavanju unakrsne kontaminacije.

25. Procijenjeni log P_{OW} može se dobiti pomoću programa za procjenu ili stručnom procjenom. Ako je vrijednost veća od šest, treba pobliže nadzirati korekcije slijepih proba i prenošenje analizirane tvari. Slično tomu, ako procijenjeni log P_{OW} premašuje šest, obvezna je primjena surogatnog standarda za korekciju rekuperacije kako bi se mogli postići visoki faktori prethodne koncentracije. Komercijalno su dostupni brojni softverski programi za procjenu log P_{OW} [1], npr. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) i ACD log P (19). Opis pristupa procjeni može se pronaći u referencama (20. - 22.).

26. Granice kvantifkacije (LOQ) za određivanje ispitivane tvari u 1-oktanolu i vodi određuju se primjenom prihvaćenih metoda. Kao zlatno pravilo, granica kvantifikacije ove metode može se odrediti kao koncentracija u vodi ili 1-oktanolu koja proizvodi omjer signala i šuma jednak deset. Valja odabrati prikladnu metodu ekstrakcije i prethodne koncentracije, a također treba navesti i analitičke rekuperacije. Odabire se prikladan faktor prethodne koncentracije kako bi se dobio signal željene veličine nakon analitičkog određivanja.

[1] Ova se informacija navodi samo kao pomoć korisniku. Mogu se rabiti ostali ekvivalentni računalni programi ako se pokaže da pružaju jednake rezultate.

▼M4

27. Na temelju parametara analitičke metode i očekivanih koncentracija određuje se približna veličina uzorka potrebna za precizno određivanje koncentracije spoja. Treba izbjegavati primjenu uzoraka vode koji su premali za dobivanje dovoljnog analitičkog signala. Također valja izbjegavati primjenu prekomjerno velikih uzoraka vode jer bi u protivnom moglo preostati premalo vode za minimalni broj traženih analiza (n = 5). U Dodatku 1. minimalni volumen uzorka izražen je kao funkcija volumena posude, LOD-a ispitivane tvari i topljivosti ispitivane tvari.

28. Kvantifikacija ispitivanih tvari odvija se usporedbom s kalibracijskim krivuljama odgovarajućeg spoja. Koncentracije u analiziranim uzorcima moraju se točno odrediti pomoću koncentracija standarda.

29. Za ispitivane tvari s procijenjenom vrijednošću log P_{OW} višom od šest surogatni standard valja ubaciti u uzorak vode prije ekstrakcije kako bi se utvrdili gubici tijekom ekstrakcije i prethodne koncentracije uzoraka vode. Za preciznu korekciju rekuperacije surogati moraju imati svojstva vrlo slična ili identična svojstvima ispitivane tvari. Po mogućnosti se u tu svrhu upotrebljavaju (stabilne) izotopično označene analogne tvari od interesa (primjerice perdeuterirane ili označene s ^{13}C). Ako nije moguće upotrijebiti označene stabilne izotope, npr. ^{13}C ili ^{2}H, iz pouzdanih podataka iz literature treba dokazati da su fizikalno-kemijska svojstva surogata vrlo slična svojstvima ispitivane tvari. Tijekom ekstrakcije tekućina-tekućina vodene faze mogu nastati emulzije. Emulzije se mogu smanjiti dodavanjem soli i puštanjem emulzije da se preko noći istaloži. Treba izvijestiti o metodama koje su se koristile za ekstrakciju i prethodnu koncentraciju uzoraka.

30. Ako je potrebno, uzorci uzeti iz faze 1-oktanola mogu se prije analize razrijediti prikladnim otapalom. Štoviše, primjena surogatnih standarda za korekciju rekuperacije preporučuje se za tvari za koje su pokusi rekuperacije pokazali visok stupanj varijacije u pokusima rekuperacije (relativna standardna devijacija > 10 %).

31. Treba izvijestiti o pojedinostima analitičke metode. To obuhvaća metodu ekstrakcije, prethodne koncentracije i faktore razrjeđivanja, parametre instrumenata, rutinu kalibriranja, raspon kalibriranja, analitičku rekuperaciju ispitivane tvari iz vode, dodavanje surogatnih standarda radi korekcije rekuperacije, vrijednosti slijepih proba, granice detekcije i granice kvantifikacije.

Provođenje ispitivanja

Optimalni omjeri volumena 1-oktanola i vode

32. Pri odabiru volumena vode i 1-oktanola u obzir valja uzeti LOQ u 1-oktanolu i vodi, faktore prethodne koncentracije primijenjene na uzorke vode, količine uzorkovane u 1-oktanolu i vodi te očekivane koncentracije. Zbog razloga vezanih uz pokus količinu 1-oktanola u sustavu za sporo miješanje treba odabrati tako da je sloj 1-oktanola dovoljne debljine (> 0,5 cm) kako bi se omogućilo uzorkovanje faze 1-oktanola bez njegova miješanja.

33. Tipični omjeri faza koji se koriste za određivanje spojeva s log P_{OW} od 4,5 i višim iznose 20 do 50 ml 1-oktanola i 950 do 980 ml vode u posudi od jedne litre.

▼M4

Uvjeti ispitivanja

34. Tijekom ispitivanja reakcijska posuda temperira se kako bi se variranje temperature smanjilo na ispod 1 °C. Analizu treba provesti na 25 °C.

35. Sustav pokusa treba zaštititi od danjeg svjetla bilo provođenjem pokusa u mračnoj prostoriji bilo pokrivanjem reakcijske posude aluminijskom folijom.

36. Pokus treba provesti u okolišu bez prašine (koliko je to moguće).

37. Sustav 1-oktanola i vode miješa se dok se ne postigne ravnoteža. U pilotskom pokusu trajanje razdoblja uravnoteženja određuje se provođenjem pokusa sa sporim miješanjem i periodičnim uzorkovanjem vode i 1-oktanola. Trenutke uzorkovanja treba rasporediti tijekom minimalnog razdoblja od pet sati.

38. Svako određivanje P_{OW} treba obaviti primjenom najmanje triju neovisnih pokusa sa sporim miješanjem.

Određivanje trajanja uravnoteženja

39. Pretpostavlja se da se ravnoteža postigla kad regresija omjera koncentracije 1-oktanola i vode u ovisnosti o vremenu tijekom vremenskog razdoblja od četiri vremenske točke rezultira nagibom koji se znatno ne razlikuje od nule na p-razini od 0,05. Minimalno trajanje uravnoteženja iznosi jedan dan prije početka uzorkovanja. Kao zlatno pravilo, uzorkovanje tvari čiji je procijenjeni log P_{OW} manji od pet može se obaviti tijekom drugog i trećeg dana. Uravnoteženje će se možda produljiti za više hidrofobnih spojeva. Za spoj čiji je log P_{OW} 8,23 (dekaklorobifenil) za uravnoteženje su bila dovoljna 144 sata. Uravnoteženje se ocjenjuje ponovljenim uzorkovanjem iz jedne posude.

Početak pokusa

40. Na početku pokusa reakcijska posuda puni se vodom zasićenom 1-oktanolom. Treba omogućiti dovoljno vremena za postizanje temperature određene termostatom.

41. Željena količina ispitivane tvari (otopljene u potrebnom volumenu 1-oktanola zasićenog vodom) pažljivo se dodaje u reakcijsku posudu. Ovo je ključni korak u pokusu jer treba izbjeći turbulentno miješanje dviju faza. Stoga se faza 1-oktanola može polako pipetirati uza stjenku pokusne posude, blizu površine vode. Kasnije će teći niza staklenu stjenku i stvoriti film iznad vodene faze. Uvijek treba izbjegavati dekantiranje 1-oktanola izravno u tikvicu. Kapljice 1-oktanola ne smiju pasti izravno u vodu.

42. Kad se započne s miješanjem, treba ga postupno ubrzavati. Ako se motori za miješanje ne mogu prikladno ugoditi, treba razmisliti o primjeni pretvarača. Brzinu miješanja treba ugoditi tako da se na kontaktu vode i 1-oktanola stvori vrtlog dubine od 0,5 do maksimalno 2,5 cm. Brzinu miješanja treba smanjiti ako je dubina vrtloga veća od 2,5 cm. U protivnom bi se mogle stvoriti mikro-kapljice iz kapljica 1-oktanola u vodenoj fazi, što bi dovelo do previsoke procjene koncentracije ispitivane tvari u vodi. Maksimalna brzina miješanja od 2,5 cm preporučuje se na temelju spoznaja validacijske studije s prstenastim testovima (5). Riječ je o kompromisu između postizanja velike brzine uravnoteženja, ujedno uz ograničavanje formiranja mikro-kapljica 1-oktanola.

▼M4

Uzorkovanje i obrada uzoraka

43. Prije uzorkovanja treba isključiti miješalicu i pustiti da se tekućine prestanu gibati. Po završetku uzorkovanja miješalica se ponovno polako pokreće, kao što je gore opisano, a brzina miješanja postupno se povećava.

44. Vodena faza uzorkuje se iz zapornog ventila na dnu reakcijske posude. Uvijek bacite volumen vode koji se nalazi u čepovima (otprilike 5 ml u posudi prikazanoj u Dodatku 2.). Voda u čepovima ne miješa se te stoga nije uravnotežena s ostatkom. Zabilježite volumen uzoraka vode i osigurajte da se pri izračunu bilance mase u obzir uzme i količina ispitivane tvari u bačenoj vodi. Gubici radi isparavanja moraju se svesti na minimum na način da se pusti da voda mirno teče u lijevak za odvajanje tako da se ne uznemiruje sloj vode/1-oktanola.

45. Uzorci 1-oktanola dobivaju se uzimanjem malog alikvota (oko 100 μl) iz sloja 1-oktanola pomoću štrcaljke od stakla i metala od 100 mikrolitara. Treba biti pažljiv kako se ne bi uznemirila granica. Treba zabilježiti volumen uzorkovane tekućine. Dovoljan je mali alikvot jer će se uzorak 1-oktanola razrijediti.

46. Treba izbjegavati nepotrebne korake prijenosa uzoraka. Stoga volumen uzorka treba odrediti gravimetrijski. U slučaju uzoraka vode to se može postići skupljanjem uzorka vode u lijevak za odvajanje koji već sadržava potreban volumen otapala.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

47. Prema ovoj ispitnoj metodi P_{OW} se određuje provođenjem triju pokusa sa sporim miješanjem (triju pokusnih jedinica) predmetnog spoja uz primjenu identičnih uvjeta. Regresija primijenjena za pokazivanje stečenog uravnoteženja treba se temeljiti na rezultatima najmanje četiri određivanja C_O/C_W u uzastopnim vremenskim točkama. To omogućuje izračun varijance kao mjere nesigurnosti prosječne vrijednosti dobivene u svakoj pokusnoj jedinici.

48. P_{OW} se može okarakterizirati varijancom podataka dobivenih za svaku pokusnu jedinicu. Taj se podatak upotrebljava za izračun P_{OW} kao ponderiranog prosjeka rezultata individualnih pokusnih jedinica. Za to se kao faktor ponderiranja upotrebljava obrnuta varijanca rezultata pokusnih jedinica. Kao rezultat toga, podaci s velikim odstupanjem (izraženim kao varijanca) te time i s manjom pouzdanošću manje utječu na rezultat od podataka s niskom varijancom.

49. Analogno tome izračunava se ponderirana standardna devijacija. Ona karakterizira ponavljanje mjerenja P_{OW}. Niska vrijednost ponderirane standardne devijacije ukazuje na to da je određivanje P_{OW} često ponavljano u jednom laboratoriju. U nastavku slijedi pregled formalne statističke obrade podataka.

▼M4

Obrada podataka

Prikaz stečenog stanja ravnoteže

50. Logaritam omjera koncentracije ispitivane tvari u 1-oktanolu i vodi (log (C_O/C_w)) izračunava se za svako vrijeme uzorkovanja. Postizanje kemijske ravnoteže prikazuje se grafičkim prikazom tog omjera u ovisnosti o vremenu. Plato u tom grafikonu temelji se na najmanje četiri uzastopne vremenske točke pokazuje da je postignuta ravnoteža i da je spoj doista otopljen u 1-oktanolu. Ako tomu nije tako, ispitivanje treba nastaviti provoditi sve dok četiri uzastopne vremenske točke ne dadnu nagib koji se ne razlikuje značajno od 0 na p-razini od 0,05, pokazujući da log C_o/C_w ne ovisi o vremenu.

Izračun log P_{OW}

51. Vrijednost log P_{OW} pokusne jedinice izračunava se kao ponderirana prosječna vrijednost log C_o/C_w za dio krivulje log C_o/C_w u ovisnosti o vremenu za koji se pokazuje ravnoteža. Ponderirani prosjek izračunava se ponderiranjem podataka s obrnutom vrijednošću varijance tako da utjecaj podataka na konačni rezultat bude obrnuto proporcionalan nesigurnosti podataka.

Prosječni log P_{OW}

52. Prosječna vrijednost log P_{OW} iz različitih pokusnih jedinica izračunava se kao prosjek rezultata pojedinačnih pokusnih jedinica ponderiran njihovim odgovarajućim varijancama.

To se izračunava na sljedeći način:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

gdje je

$\log P_{OW,i}$ = vrijednost log P_{OW} pojedinačne pokusne jedinice i;

$\log P_{OW,Av}$ = ponderirana prosječna vrijednost određivanja pojedinačnog P_{OW}

w_i = statistički ponder dodijeljen vrijednosti log P_{OW} pokusne jedinice i.

Recipročna vrijednost varijance log $P_{OW,i}$ upotrebljava se kao $w_i (w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1})$

53. Pogreška u prosjeku vrijednosti log P_{OW} procjenjuje se kao ponovljivost log C_o/C_w određena tijekom faze ravnoteže u pojedinačnim pokusnim jedinicama. Izražena je kao ponderirana standardna devijacija vrijednosti log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{logPow,Av}$) koja je pak mjera pogreške povezane s log $P_{OW,Av}$. Ponderirana standardna devijacija može se izračunati iz ponderirane varijance $var_{log\ Pow,Av}$ na sljedeći način:

$$\text{var}_{\log \text{Pow,Av}} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log \text{Pow,Av}} = (\text{var}_{\log \text{Pow,Av}})^{0,5}$$

Simbol n predstavlja broj pokusnih jedinica.

▼M4

Izvješće o ispitivanju

54. U izvješću o ispitivanju treba navesti sljedeće informacije:

Ispitivana tvar:

— trivijalni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (koja navodi položaj oznake ako se upotrebljava radioaktivno označena tvar) te relevantna fizikalno-kemijska svojstva (vidjeti stavak 17.),

— čistoća (nečistoće) ispitivane tvari,

— čistoća oznake označenih kemikalija i molarna aktivnost (po potrebi),

— preliminarna procjena vrijednosti log P_{ow} kao i metoda korištena za dobivanje te vrijednosti.

Uvjeti ispitivanja:

— datumi provođenja ispitivanja,

— temperatura tijekom pokusa,

— volumeni 1-oktanola i vode na početku ispitivanja,

— volumeni uzorkovanog 1-oktanola i vode,

— volumeni 1-oktanola i vode preostali u ispitnim posudama,

— opis ispitnih posuda i uvjeta miješanja (geometrija štapića za miješanje i ispitne posude, visina vrtloga u mm te, ako je dostupna, brzina miješanja),

— analitičke metode primijenjene za određivanje ispitivane tvari i granica kvantifikacije metode,

— vremena uzorkovanja,

— pH vodene faze i korišteni puferi ako je pH prilagođen za ionizirajuće molekule,

— broj određivanja.

Rezultati:

— ponovljivost i osjetljivost korištenih analitičkih metoda,

— određene koncentracije ispitivane tvari u 1-oktanolu i vodi kao funkcija vremena,

— prikaz bilance mase,

— temperatura i standardna devijacija ili raspon temperature tijekom pokusa,

— regresija omjera koncentracije u ovisnosti o vremenu,

— prosječna vrijednost log $P_{ow,Av}$ i njezina standardna pogreška,

— rasprava i tumačenje rezultata,

▼**M4**

— primjeri neobrađenih podataka, brojke reprezentativne analize (svi neobrađeni podaci moraju se spremati u skladu s GLP standardima), uključujući rekuperaciju surogata te broj razina upotrijebljenih pri kalibriranju (zajedno s kriterijima za koeficijent korelacije kalibracijske krivulje) te rezultati osiguranja kvalitete/kontrole kvalitete (QA/QC),

— ako je dostupno: izvješće o potvrđivanju postupka analize (treba navesti među referencama).

LITERATURA

1. De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring" method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

2. Poglavlje A.8 ovog Dodatka, Koeficijent razdjeljenja.

3. Poglavlje A.8 ovog Dodatka, Koeficijent razdjeljenja.

4. OECD (2000.). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Pariz.

5. Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6. Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8. Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

9. OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Pariz.

10. Poglavlje A.6 ovog Dodatka, Topljivost u vodi.

11. Poglavlje C.7 ovog Dodatka, Razgradnja – abiotička razgradnja: hidroliza kao funkcija pH.

12. Poglavlje C.4 - Dio II –VII (Metoda A do F) ovog Dodatka, Određivanje „lake" biorazgradivosti.

13. Poglavlje A.4 ovog Dodatka, Tlak pare.

14. Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

15. Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

16. Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17. Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18. Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20. Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21. Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

22. Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Dodatak 1.

Tablica za izračun minimalnih volumena vode potrebnih za detekciju ispitivanih tvari raličitih vrijednosti log P_{OW} u vodenoj fazi

Pretpostavke:

— Maksimalni volumen pojedinačnih alikvota = 10 % ukupnog volumena; 5 alikvota = 50 % ukupnog volumena.

— Koncentracija ispitivanih tvari = 0,7 × topljivosti u svakoj fazi. U slučaju nižih koncentracija bit će potrebni veći volumeni.

— Volumen upotrijebljen za određivanje LOD-a = 100 ml.

— log P_{ow} u ovisnosti o log S_w i log P_{ow} u ovisnosti o SR (S_{oct}/S_w) predstavljaju razumne odnose za ispitivane tvari.

Procjena S_w

log P_{ow}	jednadžba	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 3,192	6,427E-04

Procjena S_{oct}

log P_{ow}	jednadžba	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Ukupna masa ispitivane tvari (mg)	$masa_{oct}/masa_{water}$	$masa_{H2O}$ (mg)	$konc_{H2O}$ (mg/l)	$masa_{oct}$ (mg)	$konc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Izračun volumena

Minimalni volumen potreban za fazu H_2O za svaku koncentraciju LOD

log K_{ow}	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volumen upotrijebljen za LOD (l)	0,1					

Legenda uz izračun

Predstavlja < 10 % ukupnog volumena vodene faze, posuda za uravnoteženje od 1 litre.

Predstavlja < 10 % ukupnog volumena vodene faze, posuda za uravnoteženje od 2 litre.

Predstavlja < 10 % ukupnog volumena vodene faze, posuda za uravnoteženje od 5 litre.

Predstavlja < 10 % ukupnog volumena vodene faze, posuda za uravnoteženje od 10 litre.

Premašuje 10 % čak i posude za izjednačenje od 10 litri.

▼M4

Potrebni pregled volumena, kao funkcija topljivosti u vodi i log P_{ow}

Minimalni volumen potreban za fazu H_2O za svaku koncentraciju LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

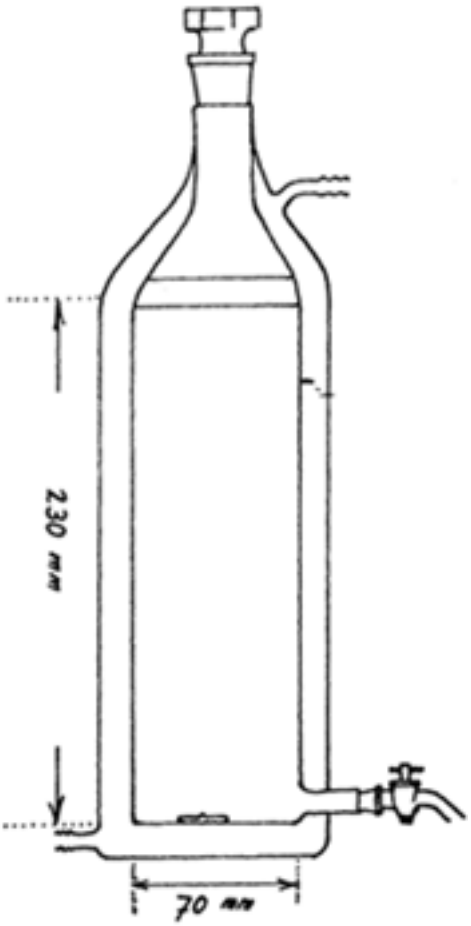
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen upotrijebljen za LOD (l)		0,1					

▼M4

Dodatak 2.

Primjer ispitne posude obložene staklom za pokus sa sporim miješanjem radi određivanja P_{OW}



▼M6

A.24. KOEFICIJENT RAZDJELJENJA (N-OKTANOL/VODA), METODA VISOKOUČINKOVITE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 117 (2004.).

1. Koeficijent razdjeljenja (P) definira se kao omjer uravnoteženih koncentracija otopljene tvari u dvofaznom sustavu koji obuhvaća dva otapala koja uglavnom nije moguće miješati. U slučaju n-oktanola i vode:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{voda}}}$$

Budući da je koeficijent razdjeljenja količnik dviju koncentracija, nema dimenzija i najčešće se navodi kao logaritam s bazom 10.

2. P_{ow} je ključni parametar u studijama o ostanku kemijskih tvari u okolišu. Utvrđeno je da postoji vrlo značajan odnos između vrijednosti P_{ow} neioniziranog oblika tvari i njihove bioakumulacije u ribama. Isto je tako utvrđeno da je P_{ow} koristan parametar u predviđanju adsorpcije na tlo i sedimente te za utvrđivanje kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti za široki raspon bioloških učinaka.

3. Izvorni prijedlog ove ispitne metode temeljio se na članku C. V. Eadsfortha i P. Mosera (1). Tijekom 1986. Savezni ured za okoliš (Umweltbundesamt) Savezne Republike Njemačke koordinirao je razvoj ispitne metode i OECD-ovo međulaboratorijsko poredbeno ispitivanje (2).

POČETNA RAZMATRANJA

4. Vrijednosti log P_{ow} u rasponu od –2 do 4 (povremeno do 5 i više) ([1]) mogu se odrediti pokusom primjenom metode protresanja tikvice (poglavlje A.8. ovog Priloga, OECD-ova smjernica za ispitivanje 107). Metoda HPLC obuhvaća vrijednosti log P_{ow} u rasponu od 0 do 6 (1) (2) (3) (4) (5). U okviru te metode može biti nužno procijeniti vrijednosti P_{ow} kako bi se dodijelile prikladne referentne tvari i potkrijepili svi zaključci temeljeni na podacima dobivenima ispitivanjem. O metodama izračuna ukratko se govori u Dodatku ovoj ispitnoj metodi. Metoda HPLC ima izokratičan način djelovanja.

5. Vrijednosti P_{ow} ovise o okolišnim uvjetima, kao što su temperatura, pH, ionska jakost itd., koji moraju biti utvrđeni u pokusu radi ispravnog tumačenja podataka o vrijednostima P_{ow}. Druga metoda, koja bi se mogla primijeniti kao alternativna (npr. nacrt OECD-ove smjernice o pH-metrijskoj metodi za ionizirajuće tvari (6)), može postati dostupna za ionizirajuće tvari. Iako navedeni nacrt OECD-ove smjernice može biti prikladan za određivanje vrijednosti P_{ow} za ionizirajuće tvari, u nekim je slučajevima primjerenije primijeniti metodu HPLC pri pH-vrijednosti koja je relevantna za okoliš (vidjeti stavak 9.).

([1]) Primjena gornje granice proizlazi iz potrebe da se postigne faza potpune separacije nakon prilagođavanja ravnoteže razdjeljenja i prije uzimanja uzoraka za analitička određivanja. Uz poseban oprez, gornja se granica može proširiti na vrijednosti veće od P_{ow}

▼M6

NAČELO METODE

6. HPLC obrnutih faza provodi se na analitičkim kolonama koje su napunjene komercijalno dostupnom krutom fazom koja sadržava duge lance ugljikovodika (npr. C8, C18), kemijski vezane na silicijev dioksid.

7. Kemikalija ubrizgana u takvu kolonu prenosi se duž kolone mobilnom fazom te se razdjeljuje između mobilne faze otapala i stacionarne faze ugljikovodika. Tvari se zadržavaju proporcionalno svojem koeficijentu razdjeljenja ugljikovodik/voda, pri čemu hidrofilne tvari eluiraju prve, a lipofilne posljednje. Vrijeme zadržavanja opisuje se faktorom kapaciteta k, koji se izražava kao:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

gdje je t_R vrijeme zadržavanja ispitivane tvari, a t_0 mrtvo vrijeme, tj. prosječno vrijeme koje je molekuli otapala potrebno za prolaz kroz kolonu. Ne zahtijevaju se kvantitativne analitičke metode i potrebno je samo odrediti vremena zadržavanja.

8. Koeficijent razdjeljenja ispitivane tvari između oktanola i vode može se izračunati tako da se pokusom odredi njezin faktor kapaciteta k, koji se potom uvrštava u sljedeću jednadžbu:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

gdje su

a, b = koeficijenti linearne regresije.

Navedena jednadžba može se dobiti linearnom regresijom logaritma koeficijenata razdjeljenja referentnih tvari između oktanola i vode u donosu na logaritam faktora kapaciteta referentnih tvari.

9. Metoda HPLC obrnutih faza omogućuje procjenu koeficijenata razdjeljenja u području log P_{ow} od 0 do 6, ali se u iznimnim slučajevima to područje može proširiti tako da obuhvaća i vrijednosti log P_{ow} u rasponu od 6 do 10. To može zahtijevati modificiranje mobilne faze (3). Metoda nije primjenjiva na jake kiseline i baze, metalne komplekse, tvari koje reagiraju s eluensom ili površinski aktivna sredstva. Mjerenja se mogu provoditi na ionizirajućim tvarima kad su u neioniziranom obliku (slobodne kiseline ili slobodne baze) jedino primjenom odgovarajućeg pufera čija je pH-vrijednost manja od vrijednosti pK_a ako je riječ o slobodnoj kiselini ili je veća od pK_a vrijednosti ako je riječ o slobodnoj bazi. Alternativno, može postati dostupna pH-metrijska metoda za ispitivanje ionizirajućih tvari (6) koja bi se mogla primijeniti kao alternativna metoda (6). Ako se vrijednost log P_{ow} određuje za primjenu u klasifikaciji opasnosti za okoliš ili u procjeni rizika za okoliš, ispitivanje treba provesti u rasponu pH-vrijednosti relevantnom za prirodni okoliš, tj. za pH-vrijednosti od 5,0 do 9.

10. U nekim slučajevima nečistoće mogu otežati tumačenje rezultata jer nije moguće sa sigurnošću odrediti pikove. Za smjese koje daju nerazlučeni pojas treba navesti gornju i donju granicu vrijednosti log P_{ow} te postotak površine svakog pika vrijednosti log P_{ow}. Za smjese koje se sastoje od skupine homologa treba navesti i ponderirani prosječni log P_{ow} (7), izračunan na temelju pojedinačnih vrijednosti P_{ow} i odgovarajućih postotaka površine (8). Pri izračunu treba uzeti u obzir sve pikove koji čine 5 % ili više ukupne površine svih pikova (9):

▼**M6**

$$\textit{ponderirani prosječni } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{površina \%})}{\textit{ukupna površina svih pikova \%}} = \frac{\sum (\textit{log } P_{owi})(\textit{površina \%}_i)}{\sum_i \textit{površina \%}}$$

Ponderirana prosječna vrijednost log P_{ow} valjana je jedino za tvari ili smjese (npr. talova ulja) koje se sastoje od homologa (npr. niza alkana). Mjerenjem smjesa mogu se dobiti smisleni rezultati pod uvjetom da je upotrijebljeni analitički detektor jednako osjetljiv na sve tvari u smjesi i da se može razlučiti. na odgovarajući način

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

11. Prije primjene metode moraju biti poznati konstanta disocijacije, strukturna formula i topljivost u mobilnoj fazi. Osim toga, bile bi korisne i informacije o hidrolizi.

KRITERIJI KVALITETE

12. Da bi se povećala pouzdanost mjerenja, moraju se provoditi dvostruka određivanja.

— Ponovljivost: Vrijednost log P_{ow} dobivena ponavljanim mjerenjima provedenima u identičnim uvjetima s istom skupinom referentnih tvari mora biti u području ± 0,1 logaritamskih jedinica.

— Obnovljivost: Ako se mjerenja ponavljaju s drukčijom skupinom referentnih tvari, rezultati se mogu razlikovati. Koeficijent korelacije R za odnos između vrijednosti log k i vrijednosti log P_{ow} za skupinu ispitivanih tvari obično iznosi oko 0,9, što odgovara koeficijentima razdjeljenja oktanol/voda za log P_{ow} ± 0,5 logaritamskih jedinica.

13. Međulaboratorijsko poredbeno ispitivanje pokazalo je da se metodom HPLC mogu dobiti vrijednosti log P_{ow} koje su unutar ± 0,5 jedinica vrijednosti dobivenih metodom protresanja u tikvici (2). Ostale se usporedbe mogu pronaći u literaturi (4) (5) (10) (11) (12). Najtočnije rezultate pružaju korelacijski grafovi koji se temelje na strukturno srodnim referentnim tvarima (13).

REFERENTNE TVARI

14. Radi postavljanja korelacije između izmjerenog faktora kapaciteta k neke tvari i njezine vrijednosti P_{ow}, potrebno je uspostaviti kalibracijsku krivulju s pomoću najmanje šest točaka (vidjeti stavak 24.). Odgovarajuće referentne tvari odabire korisnik. Referentne tvari obično moraju imati vrijednosti log P_{ow} koje obuhvaćaju log P_{ow} ispitivane tvari, tj. najmanje jedna referentna tvar mora imati vrijednost P_{ow} veću od vrijednosti P_{ow} ispitivane tvari, a vrijednost P_{ow} druge tvari mora biti manja od vrijednosti P_{ow} ispitivane tvari. Ekstrapolaciju bi trebalo primjenjivati samo u iznimnim slučajevima. Poželjno je da referentne tvari budu strukturno srodne s ispitivanom tvari. Vrijednosti log P_{ow} referentnih tvari koje se upotrebljavaju za kalibraciju moraju se temeljiti na pouzdanim pokusnim podacima. Međutim, za tvari koje imaju visoki log P_{ow} (obično veći od 4) mogu se upotrebljavati izračunane vrijednosti, osim ako su dostupni pouzdani pokusni podaci. Ako se upotrebljavaju ekstrapolirane vrijednosti, treba navesti graničnu vrijednost.

15. Dostupni su iscrpni popisi vrijednosti log P_{ow} za mnoge skupine kemikalija (14)(15). Ako podaci o koeficijentima razdjeljenja strukturno srodnih tvari nisu dostupni, može se primijeniti općenitija kalibracija utvrđena s drugim referentnim tvarima. Preporučene referentne tvari i njihove vrijednosti P_{ow} navedene su u tablici 1. Kod ionizirajućih tvari navedene se vrijednosti primjenjuje na njihov neionizirani oblik. Vjerodostojnost i kvaliteta vrijednosti provjereni su međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjem.

▼**M6**

Tablica 1.

Preporučene referentne tvari

	Broj CAS	Referentna tvar	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanon (Metil etil keton)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzil-alkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksiocetna kiselina	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzil alkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzojeva kiselina	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Cinamil alkohol (Cinaminski alkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzojeva kiselina	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Cimetova kiselina	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Metil benzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzojeva kiselina	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trikloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Etil benzoat	2,6	

▼**M6**

	Broj CAS	Referentna tvar	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diklorobenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-klorobenzojeva kiselina	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroanilin	2,8	
35	108-90-7	Klorobenzen	2,8	
36	1746-13-0	Alil-fenil-eter	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzen	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklorbenzen	3,4	
43	122-39-4	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenil benzoat	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benzil benzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklorobenzen	4,2	
52	143-07-7	Dodekanska kiselina	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenil eter	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranten	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

OPIS METODE

Preliminarna procjena koeficijenta razdjeljenja

16. Ako je potrebno, koeficijent razdjeljenja ispitivane tvari može se procijeniti, i to po mogućnosti metodom izračuna (vidjeti Dodatak) ili, kad je to primjereno, primjenom omjera topljivosti ispitivane tvari u čistim otapalima.

Aparatura

17. Potreban je tekućinski kromatograf opremljen pumpom niske pulsacije i prikladnim sustavom za detektiranje. UV detektor s valnom duljinom detekcije od 210 nm ili RI detektor primjenjivi su za široki spektar kemijskih skupina. Prisutnost polarnih skupina u stacionarnoj fazi može ozbiljno ugroziti rad kolone HPLC-a. Stoga bi stacionarna faza trebala sadržavati minimalni postotak polarnih skupina (16). Mogu se upotrebljavati trgovačka pakiranja mikročestica inverzne faze ili gotove kolone. Između sustava za ubrizgavanje i analitičke kolone može se postaviti pretkolona.

Mobilna faza

18. Za pripremu eluacijskog otapala, koje se prije uporabe otplinjava, upotrebljava se metanol HPLC čistoće i destilirana ili deionizirana voda. Treba primijeniti izokratičku eluaciju. Treba upotrijebiti omjere metanola i vode s minimalnim udjelom vode od 25 %. Obično je omjer mješavine metanola i vode 3: 1 (v/v) zadovoljavajući za eluiranje tvari s vrijednošću log P 6 unutar jednog sata kod brzine protoka od 1 ml/min. Za tvari čiji je log P veći od 6 možda će trebati skratiti vrijeme eluiranja (i vrijeme eluiranja referentnih tvari) smanjivanjem polariteta mobilne faze ili duljine kolone.

19. Ispitivana tvar i referentne tvari trebale bi biti topljive u mobilnoj fazi u koncentracijama koje su dovoljne za njihovu detekciju. S mješavinom metanola i vode smiju se upotrebljavati aditivi, ali samo u iznimnim slučajevima, jer aditivi mijenjaju svojstva kolone. U tim se slučajevima mora potvrditi da nema utjecaja na vrijeme zadržavanja ispitivane tvari i referentnih tvari. Ako mješavina metanola i vode nije prikladna, mogu se upotrebljavati mješavine drugih organskih otapala i vode, npr. etanola i vode, acetonitrila i vode ili izopropil alkohola (2-propanola) i vode.

20. pH eluensa od kritične je važnosti za ionizirajuće tvari. pH-vrijednost mora biti u radnom području pH-vrijednosti kolone, obično između 2 i 8. Preporučuje se puferiranje. Treba paziti da ne dođe do taloženja soli i propadanja kolone, što se događa kod nekih smjesa organske faze i pufera. Kod stacionarnih faza koje se temelje na silicijevu dioksidu s pH-vrijednošću iznad 8 ne preporučuje se mjerenje kromatografijom HPLC, jer upotreba alkalne mobilne faze može brzo uzrokovati slabije funkcioniranje kolone.

Otopljene tvari

21. Ispitivane i referentne tvari moraju biti dovoljno čiste kako bi se na kromatogramima mogli odrediti pikovi odgovarajućih tvari. Tvari koje se upotrebljavaju za ispitivanje ili u svrhu kalibracije otapaju se po mogućnosti u mobilnoj fazi. Ako se za otapanje ispitivanih i referentnih tvari upotrebljava neko drugo otapalo, a ne mobilna faza, mobilnu fazu treba upotrijebiti za konačno razrjeđivanje prije ubrizgavanja.

Uvjeti ispitivanja

22. Za vrijeme mjerenja temperatura ne bi smjela varirati za više od ± 1 °C.

▼M6

Određivanje mrtvog vremena t_o

23. Mrtvo vrijeme t_0 može se izmjeriti uporabom nezadržanih organskih tvari (npr. tiouree ili formamida). Preciznije mrtvo vrijeme može se odrediti iz izmjerenih vremena zadržavanja ili seta od približno sedam članova homolognog niza (npr. n-alkil metil ketona) (17). Vremena zadržavanja t_R (n_C + 1) ucrtavaju se kao funkcija vremena t_R (n_C), gdje je n_C broj atoma ugljika. Dobiva se pravac t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, gdje je A, koji predstavlja $k(n_C + 1)/k(n_C)$, konstanta. Mrtvo vrijeme t_0 dobiva se iz sjecišta (1 – A)t_0 i nagiba A.

Regresijska jednadžba

24. Sljedeći je korak konstruiranje korelacijske krivulje vrijednosti log k u odnosu na log P za odgovarajuće referentne tvari s vrijednostima log P koje su u blizini vrijednosti koja se očekuje za ispitivanu tvar. U praksi se istodobno ubrizgava od 6 do 10 referentnih tvari. Određuju se vremena zadržavanja, poželjno na integratoru za bilježenje rezultata spojenom na sustav za detekciju. Odgovarajući logaritmi faktora kapaciteta, log k, ucrtavaju se kao funkcija vrijednosti log P. Regresijska jednadžba izvodi se u redovitim razmacima, najmanje jednom dnevno, kako bi se mogle uzeti u obzir moguće promjene u funkcioniranju kolone.

ODREĐIVANJE VRIJEDNOSTI P_{OW} ISPITIVANE TVARI

25. Ispitivana tvar ubrizgava se u najmanjim količinama koje se mogu detektirati. Vrijeme zadržavanja određuje se dva puta. Koeficijent razdjeljenja ispitivane tvari dobiva se interpolacijom izračunanog faktora kapaciteta na kalibracijski graf. Za vrlo male i vrlo velike koeficijente razdjeljenja nužna je ekstrapolacija. U tim slučajevima treba posebno voditi računa o granicama pouzdanosti linije regresije. Ako je vrijeme zadržavanja uzorka izvan raspona vremena zadržavanja dobivenih za standarde, potrebno je navesti graničnu vrijednost.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Izvješće o ispitivanju

26. U izvješću mora biti navedeno sljedeće:

— prethodna procjena koeficijenta razdjeljenja, ako je provedena, procijenjene vrijednosti i primijenjena metoda; ako je primijenjena metoda izračuna, njezin puni opis, uključujući identifikaciju baze podataka i detaljne informacije o izboru fragmenata,

— ispitivane i referentne tvari: čistoća, strukturna formula i broj CAS,

— opis opreme i radnih uvjeta: analitička kolona, pretkolona,

— mobilna faza, sustav detekcije, temperaturno područje, pH,

— profili eluiranja (kromatogrami),

— mrtvo vrijeme i način na koji je mjereno,

— podaci o zadržavanju i vrijednosti log P_{ow} koje se za referentne tvari upotrijebljene u kalibraciji spominju u literaturi,

— podaci o prilagođenom regresijskom pravcu (log k u odnosu na log P_{ow}) i koeficijent korelacije pravca uključujući intervale pouzdanosti,

▼**M6**

— podaci o prosječnom zadržavanju i interpolirana vrijednost log P_{ow} za ispitivanu tvar,

— u slučaju smjesa: kromatogram profila eluiranja s navedenim vrijednostima pragova,

— vrijednosti log P_{ow} u odnosu na postotak površine pika log P_{ow},

— izračun s pomoću regresijskog pravca,

— izračunane ponderirane prosječne vrijednosti log P_{ow}, prema potrebi.

LITERATURA

(1) C. V. Eadsforth i P. Moser. (1983.) Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss i H. J. Poremski. (1988.) Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C. V. Eadsforth. (1986.) Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt i R. Fuerer (1981.) Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981.) Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000.) Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995.) „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez i C. C. Karman. (1999.) An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke i K. Bansal. (1998.) Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, str. 529 – 537.

(10) L. O. Renberg, S. G. Sundstroem i K. Sundh-Nygård. (1980.) Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W. E. Hammers, G. J. Meurs i C. L. De-Ligny. (1982.) Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J. E. Haky i A. M. Young. (1984.) Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa i E. Masuhara. (1981.) Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch i A. J. Leo. (1979.) Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A. J. Leo, dir. (1982.) Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979.) The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) G. E. Berendsen, P. J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony i J. Inczédy. (1980.) On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Dodatak

Metode izračuna vrijednosti P_{OW}

UVOD

1. U ovom se dodatku navodi kratak uvod u izračunavanje vrijednosti P_{ow}. Za više informacija upućujemo na priručnike (1) (2).

2. Izračunane vrijednosti P_{ow} upotrebljavaju se za:

— donošenje odluke o tome koju eksperimentalnu metodu primijeniti: metodu protresanja tikvice za log P_{ow} između – 2 i 4 i metodu HPLC za log P_{ow} između 0 i 6,

— odabir uvjeta koji će se primijeniti pri metodi HPLC (referentne tvari, omjer metanol/voda),

— provjeru vjerodostojnosti vrijednosti dobivenih eksperimentalnim metodama,

— davanje procjene ako se eksperimentalne metode ne mogu primijeniti.

Načelo metoda izračuna

3. Metode izračuna koje se ovdje predlažu temelje se na teoretskoj fragmentaciji molekule na odgovarajuće podstrukture za koje su prirasti vrijednosti log P_{ow} poznati. Log P_{ow} se dobiva zbrajanjem vrijednosti fragmenata i korektivnih članova za intramolekulske interakcije. Popisi konstanti fragmenata i korektivnih članova mogu se pronaći u literaturi (1) (2) (3) (4) (5) (6). Neki od njih redovito se ažuriraju (3).

Pouzdanost izračunanih vrijednosti

4. Općenito, što je složenija tvar koji se proučava, pouzdanost metoda izračuna je manja. Kad je riječ o jednostavnim molekulama male molekulske težine i molekulama koje sadržavaju jednu ili dvije funkcionalne skupine, između rezultata različitih metoda fragmentacije i izmjerenih vrijednosti može se očekivati odstupanje od 0,1 do 0,3 log P_{ow} jedinica. Granica dopuštenih pogrešaka ovisit će o pouzdanosti primijenjenih konstanti fragmenata, mogućnosti prepoznavanja intramolekulskih interakcija (npr. vodikovih veza) i pravilnoj primjeni korektivnih članova. Kod ionizirajućih tvari moraju se uzeti u obzir naboj i stupanj ionizacije (10).

Fujita-Hanschova π-metoda

5. Konstanta hidrofobnog supstituenta, π, koju su izvorno uveli Fujita i ostali (7) definira se kao:

$$\pi X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

gdje je PhX aromatski derivat, a PhH izvorna tvar.

$$\begin{aligned} \text{npr.}\quad \pi Cl &= \log Pow\ (C6H5Cl) - \log P_{ow}\ (C6H6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

π-metoda u prvom je redu od interesa za aromatske tvari. π-vrijednosti za veliki broj supstituenata mogu se pronaći u literaturi (4) (5).

Rekkerova metoda

6. Primjenom Rekkerove metode (8) vrijednost log P_{ow} izračunava se kao:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{uvjeti interakcije})$$

▼M6

gdje je a_i broj pojavljivanja određenog fragmenta u molekuli, a f_i je prirast log P_{ow} fragmenta. Članovi interakcije mogu se izraziti kao integralni višekratnik samo jedne konstante C_m (takozvane „magične konstante”). Konstante fragmenata f_i i C_m određene iz popisa koji sadržava 1 054 eksperimentalne vrijednosti P_{ow} za 825 tvari primjenom višestruke regresijske analize (6) (8). Određivanje interakcijskih članova provodi se u skladu s utvrđenim pravilima (6) (8) (9).

Hansch-Leova metoda

7. Primjenom Hanschove i Leove metode (4) vrijednost log P_{ow} izračunava se kao:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

gdje je f_i konstanta fragmenta, F_j korektivni član (faktor), a a_i i b_j odgovarajuća učestalost pojavljivanja. Popisi atomskih i grupnih fragmentiranih vrijednosti te korektivnih članova F_j dobiveni su metodom pokušaja i pogreške te izvedeni iz eksperimentalnih vrijednosti P_{ow}. Korektivni članovi svrstani su u nekoliko različitih klasa (1) (4). Razvijeni su softverski paketi kako bi se uzela u obzir sva pravila i korektivni članovi (3).

KOMBINIRANA METODA

8. Izračunavanje vrijednosti log P_{ow} složenih molekula moguće je znatno poboljšati ako se molekula rasiječe na veće podstrukture za koje su pouzdane vrijednosti log P_{ow} dostupne bilo iz tablica (3) (4) ili iz postojećih mjerenja. Takve fragmente (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) tada je moguće kombinirati s Hanschovim π-vrijednostima ili s Rekkerovim i Leovim konstantama fragmenata.

Napomene

i. Metode izračuna mogu se primijeniti na djelomično ili potpuno ionizirane tvari samo ako se uzmu u obzir potrebni korektivni faktori.

ii. Ako se može pretpostaviti prisutnost intramolekulskih vodikovih veza, obvezatno treba dodati odgovarajuće korektivne članove (približno +0,6 do +1,0 log P_{ow} jedinica) (1). Pokazatelji prisutnosti tih veza mogu se dobiti stereomodelima ili spektroskopskim podacima.

iii. Ako je moguće više tautomernih oblika, izračun se mora temeljiti na najvjerojatnijem obliku.

iv. Treba pažljivo pratiti revizije popisa konstanti fragmenata.

LITERATURA O METODAMA IZRAČUNA

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl i D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982.)

(2) W. J. Dunn, J. H. Block i R. S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986.)

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch i A. J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979.)

▼**M6**

(5) A. J. Leo, C. Hansch i D. Elkins. (1971.) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979.) The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa i Corwin Hansch (1964.) A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R. F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977.)

(9) C. V. Eadsforth i P. Moser. (1983.) Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.

(10) R. A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, str. 225, American Chemical Society, Washington, D. C. (1984.)

▼M7

A.25. KONSTANTE DISOCIJACIJE U VODI (TITRACIJSKA METODA – SPEKTROFOTOMETRIJSKA METODA – KONDUKTOMETRIJSKA METODA)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 112 (1981.).

Preduvjeti

— prikladna analitička metoda,

— topljivost u vodi

Opće informacije

— strukturna formula,

— električna vodljivost za konduktometrijsku metodu

Posebni uvjeti

— sve se ispitne metode mogu provoditi na tvarima analitičke ili komercijalne čistoće. Potrebno je uzeti u obzir moguće učinke nečistoća na rezultate,

— titracijska metoda nije prikladna za tvari niske topljivosti (vidjeti „ispitne otopine" u nastavku),

— spektrofotometrijska metoda može se primijeniti samo na tvarima koje u disociranom obliku imaju znatno drukčiji spektar apsorpcije UV/vidljivog zračenja od onog koji imaju u nedisociranom obliku. Ta je metoda prikladna i za tvari niske topljivosti te za ne-acidobazne disocijacije, npr. stvaranje kompleksa.

— u slučajevima za koje vrijedi Onsagerova jednadžba može se primijeniti konduktometrijska metoda, čak i pri umjereno niskim koncentracijama te u slučajevima ne-acidobazne ravnoteže.

Referentni dokumenti

Ova se ispitna metoda temelji na metodama koje su navedene u literaturi čiji se popis nalazi u odjeljku „Literatura" te na EPA-inom „Preliminarnom nacrtu smjernica za obavješćivanje prije proizvodnje" (engl. *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification*, EPA) od 18. kolovoza 1978.

METODA – UVOD, SVRHA, PODRUČJE PRIMJENE, RELEVANTNOST, PRIMJENA I GRANICE ISPITIVANJA

Disocijacija određene tvari u vodi važna je za procjenu utjecaja te tvari na okoliš. Njome se određuje oblik tvari, o kojemu zatim ovisi njezino ponašanje i prijenos. Može utjecati na adsorpciju kemikalije na tla i sedimente te na apsorpciju u biološke stanice.

Definicije i jedinice

Disocijacija je reverzibilno razdvajanje na dvije ili više kemijskih vrsta koje mogu biti ionske. Proces se uobičajeno prikazuje jednadžbom

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

a koncentracijska konstanta ravnoteže za tu je reakciju

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Na primjer, u konkretnom slučaju u kojemu je R vodik (tvar je kiselina), konstanta je

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ili

$$pK_\alpha = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referentne tvari

Kod ispitivanja novih tvari nije uvijek potrebno upotrijebiti sljedeće referentne tvari. One se prije svega navode radi povremene kalibracije metode te kako bi se omogućila usporedba rezultata kod primjene neke druge metode.

	pKa ([1])	Temp. u °C
p-nitrofenol	7,15	25 ([1])
Benzojeva kiselina	4,12	20
p-kloroanilin	3,93	20

([1]) Nije dostupna vrijednost za 20 °C, ali se može pretpostaviti da je varijabilnost rezultata mjerenja veća od očekivane temperaturne ovisnosti

Bilo bi korisno imati dostupnu tvar koja ima više vrijednosti pK, kako je navedeno u nastavku u odjeljku „Načelo metode”. Takva bi tvar mogla biti:

Limunska kiselina	pK_a (8.)	Temp. u °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Načelo ispitne metode

Opisani kemijski proces općenito tek u maloj mjeri ovisi o temperaturi u rasponu temperatura koji nalazimo u okolišu. Za određivanje konstante disocijacije potrebno je znati koncentraciju disociranih i nedisociranih oblika kemijske tvari. Na temelju spoznaja o stehiometriji reakcije disocijacije navedene u odjeljku „Definicije i jedinice” može se odrediti odgovarajuća konstanta. U konkretnom slučaju opisanom u ispitnoj metodi tvar se ponaša kao kiselina ili baza pa je određivanje najprikladnije provesti mjerenjem relativnih koncentracija ioniziranog i neioniziranog oblika tvari te pH-vrijednosti otopine. Odnos između tih članova prikazan je jednadžbom za pK_a, koja je navedena u odjeljku „Definicije i jedinice”. Neke tvari imaju više od jedne konstante disocijacije te se mogu izvesti slične jednadžbe. Neke od ovdje opisanih metoda prikladne su i za ne-acidobaznu disocijaciju.

Kriteriji kvalitete

Ponovljivost

Određivanje konstante disocijacije potrebno je ponoviti (najmanje tri određivanja), a dobivene se vrijednosti moraju kretati unutar područja od ± 0,1 log jedinica.

OPIS ISPITNIH POSTUPAKA

Vrijednost pK_a. može se odrediti na dva osnovna načina. Jedan uključuje titraciju poznate količine tvari standardnom kiselinom ili bazom, ovisno o slučaju; drugi uključuje određivanje relativne koncentracije ioniziranih i neioniziranih oblika te njihove ovisnosti o pH-vrijednosti.

▼M7

Preparati

Metode koje se temelje na navedenim načelima mogu se svrstati u titracijske, spektrofotometrijske i konduktometrijske metode.

Ispitne otopine

Za titracijsku i konduktometrijsku metodu kemijsku tvar potrebno je otopiti u destiliranoj vodi. Za spektrofotometrijsku i ostale metode upotrebljavaju se puferske otopine. Koncentracija ispitivane tvari ne smije premašiti 0,01 M ili polovinu koncentracije zasićenja, ovisno o tome koja je od tih vrijednosti manja. Za pripremu otopine potrebno je upotrijebiti najčišći raspoloživi oblik tvari. Ako je tvar slabo topljiva, može se otopiti u maloj količini otapala mješljivog s vodom prije nego što se razrijedi do prethodno navedenih koncentracija.

Potrebno je provjeriti jesu li u otopinama prisutne emulzije, i to tako da se provjeri javlja li se Tyndallov efekt, posebno ako je za poboljšanje topljivosti upotrijebljeno suotapalo. Ako se upotrebljavaju puferske otopine, koncentracija pufera ne smije premašiti 0,05 M.

Ispitni uvjeti

Temperatura

Temperaturu treba održavati tako da odstupanje iznosi najviše± 1 °C. Određivanje je poželjno provoditi na temperaturi od 20 °C.

Ako se smatra da će rezultati znatno varirati ovisno o temperaturi, određivanje je potrebno provesti na još barem dvije druge temperature. U tom slučaju temperaturni intervali trebaju iznositi 10 °C, a temperaturu treba održavati tako da odstupanje iznosi najviše ± 0,1 °C.

Analize

Izbor metode ovisi o vrsti tvari koja se ispituje. Metoda mora biti dovoljno osjetljiva da se njome omogući određivanje različitih vrsta pri svakoj koncentraciji ispitne otopine.

Provođenje ispitivanja

Titracijska metoda

Ispitna otopina određuje se titracijom standardnom otopinom baze ili kiseline, ovisno o slučaju, pri čemu se nakon svakog dodavanja titranta mjeri pH. Potrebno je izvršiti najmanje deset dodavanja prije točke ekvivalencije. Ako se ravnoteža postigne dovoljno brzo, može se upotrijebiti potenciometar za bilježenje mjerenja. Za ovu je metodu potrebno točno znati količinu tvari i njezinu koncentraciju. Moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se isključio ugljikov dioksid. Detaljne pojedinosti o postupku, mjerama opreza i izračunu navedene su u standardnim ispitivanjima, npr. u literaturi 1., 2., 3., 4.

Spektrofotometrijska metoda

Valna duljina pronalazi se tamo gdje ionizirani i neionizirani oblici tvari imaju znatno drukčije koeficijente ekstinkcije. Spektar apsorpcije UV/vidljivog zračenja bilježi se kod otopina stalne koncentracije u onim uvjetima pH-vrijednosti u kojima je tvar uglavnom neionizirana i u cijelosti ionizirana te pri nekoliko srednjih pH-vrijednosti. To se može postići dodavanjem koncentrirane kiseline (baze) u relativno velik volumen otopine tvari u višekomponentnom puferu, počevši pri visokoj (niskoj) pH-vrijednosti (literatura 5.), ili dodavanjem jednakih količina matične otopine tvari, npr. u vodi ili metanolu, u stalne volumene različitih puferskih otopina kojima je obuhvaćen željeni raspon pH-vrijednosti. Iz pH-vrijednosti i vrijednosti apsorbancije na izabranoj valnoj duljini izračunava se dovoljan broj vrijednosti za pK_a, pri čemu se upotrebljavaju podaci dobiveni za najmanje pet pH-vrijednosti pri kojima stupanj ionizacije tvari iznosi najmanje 10 %, a manje od 90 %. Dodatni eksperimentalni podaci i metoda izračuna navedeni su u literaturi 1.

▼M7

Konduktometrijska metoda

S pomoću ćelije čija je konstanta mala i poznata mjeri se vodljivost oko 0,1 M otopine tvari u elektrovodljivoj vodi. Mjeri se i vodljivost određenog broja otopina dobivenih preciznim razrjeđivanjem navedene otopine. Koncentracija se svaki put smanjuje za polovinu, a nizom treba obuhvatiti barem red veličine koncentracije. Granična vrijednost vodljivosti pri beskonačnom razrjeđenju utvrđuje se sličnim pokusom sa solju Na te ekstrapolacijom. Potom se iz podataka za vodljivost svake otopine može izračunati stupanj disocijacije s pomoću Onsagerove jednadžbe te se iz toga, primjenom Ostwaldovog zakona razrjeđenja, može izračunati konstanta disocijacije s pomoću formule $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ pri čemu je C koncentracija u molovima po litri, a α je disocirana frakcija. Moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se isključio CO_2. Dodatni eksperimentalni podaci i metoda izračuna navedeni su u referentnim tekstovima i literaturi pod brojevima 1., 6. i 7.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Titracijska metoda

Vrijednost pK_a izračunava se za deset izmjerenih točaka na titracijskoj krivulji. Za te se vrijednosti pK_a izračunavaju srednja vrijednost i standardna devijacija. Grafičkom prikazu potrebno je priložiti i grafički prikaz pH-vrijednosti u ovisnosti o volumenu standardne baze ili kiseline.

Spektrofotometrijska metoda

Za svaki se spektar tablično prikazuju podaci o apsorbanciji i pH-vrijednosti. Iz točaka podataka za prijelazne spektre izračunava se najmanje pet vrijednosti za pK_a te srednja vrijednost i standardna devijacija tih rezultata.

Konduktometrijska metoda

Ekvivalentna vodljivost Λ izračunava se za svaku koncentraciju kiseline i za svaku koncentraciju smjese sastavljene od jednog ekvivalenta kiseline plus 0,98 ekvivalenta natrijeva hidroksida bez karbonata. Kiseline je više kako bi se spriječio višak OH^- koji nastaje zbog hidrolize. Grafički se prikazuje $1/\Lambda$ u ovisnosti o $\sqrt{C}$, a Λ_o soli može se utvrditi ekstrapolacijom na nultu koncentraciju.

Vrijednost Λ_o kiseline može se izračunati upotrebom vrijednosti koje su za H^+ i Na^+ navedene u literaturi. Za svaku se koncentraciju vrijednost pK_a može izračunati s pomoću formula $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ i $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$. Bolje vrijednosti za K_a mogu se dobiti tako da se izvrše korekcije s obzirom na pokretljivost i aktivnost. Potrebno je izračunati srednje vrijednosti i standardne devijacije vrijednosti pK_a.

Izvješće o ispitivanju

Potrebno je dostaviti sve sirove podatke i izračunane vrijednosti pK_a te metodu izračuna (po mogućnosti u obliku tablice kako se predlaže u literaturi 1.), kao i prethodno opisane statističke parametre. Za titracijske metode potrebno je navesti podatke o standardizaciji titranta.

Za spektrofotometrijsku metodu potrebno je dostaviti sve spektre. Za konduktometrijsku metodu potrebno je navesti podatke o određivanju konstante ćelije. Potrebno je navesti informacije o upotrijebljenim tehnikama, analitičkim metodama i vrsti svih upotrijebljenih pufera.

Potrebno je izvijestiti o ispitnoj temperaturi (ispitnim temperaturama).

LITERATURA

1. Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

2. Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, str. 1186. – 1188. (1969).

3. ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

4. Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

5. Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

6. ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

7. Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (vidjeti pod 4.).

8. *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

DIO B: METODE UTVRĐIVANJA TOKSIČNOSTI I DRUGIH UČINAKA NA ZDRAVLJE

SADRŽAJ

OPĆI UVOD

B.1. bis. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA S FIKSNOM DOZOM

B.1. tris. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA UTVRĐIVANJA KLASA AKUTNE TOKSIČNOSTI

B.2. AKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST

B.3. AKUTNA TOKSIČNOST (DERMALNA)

B.4. AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE KOŽE

B.5. AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE OKA

B.6. SENZIBILIZACIJA KOŽE

B.7. 28-DNEVNO ISPITIVANJE ORALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVACIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA

B.8. SUBAKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST: 28-DNEVNA STUDIJA

B.9. TOKSIČNOST (DERMALNA) PRI PONAVLJANOJ DOZI (28 DANA)

B.10. *IN VITRO* ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA KOD SISAVACA

B.11. ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U KOŠTANOJ SRŽI SISAVACA

B.12. MIKRONUKLEUS-TEST NA ERITROCITIMA SISAVACA

B.13./14. MUTAGENOST: TEST ZA DETEKCIJU POVRATNIH MUTACIJA POMOĆU BAKTERIJA

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

B.21. *IN VITRO* TESTOVI TRANSFORMACIJA STANICA SISAVACA

B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNIH LETALNIH GENA NA GLODAVCIMA

▼B

B.23.	ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U SPERMATOGONIJAMA SISAVACA
B.25.	NASLJEDNA TRANSLOKACIJA U MIŠEVA
B.26.	TEST SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVCIMA – 90-DNEVNA STUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA
B.27.	TEST SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI – 90-DNEVNO ISPITIVANJE ORALNE TOKSIČNOSTI NA NEGLODAVCIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA
B.28.	TEST SUBKRONIČNE DERMALNE TOKSIČNOSTI – 90-DNEVNO ISPITIVANJE DERMALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVCIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA
B.29.	SUBKRONIČNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST: 90-DNEVNA STUDIJA
B.30.	STUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI
B.31.	STUDIJA PRENATALNE RAZVOJNE TOKSIČNOSTI
B.32.	STUDIJE KARCINOGENOSTI
B.33.	KOMBINIRANE STUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI/KARCINOGENOSTI
B.34.	TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA JEDNOJ GENERACIJI
B.35.	STUDIJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA DVIJE GENERACIJE
B.36.	TOKSIKOKINETIKA
B.37.	ODGOĐENA NEUROTOKSIČNOST ORGANOFOSPORNIH TVARI NAKON AKUTNOG IZLAGANJA
B.38.	STUDIJA ODGOĐENE NEUROTOKSIČNOSTI ORGANOFOSPORNIH TVARI – PONAVLJANO DOZIRANJE TIJEKOM 28 DANA
B.39.	TEST NEPLANIRANE SINTEZE DNK (UDS) NA STANICAMA JETRE SISAVACA *IN VIVO*
B.40.	NAGRIZANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER)
B.40.BIS	NAGRIZANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUIRANE LJUDSKE EPIDERME (RhE)
B.41.	TEST FOTOTOKSIČNOSTI *IN VITRO* 3T3 NRU
B.42.	PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA

▼B

B.43. STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI KOD GLODAVACA

B.44. APSORPCIJA PUTEM KOŽE: METODA *IN VIVO*

B.45. APSORPCIJA PUTEM KOŽE: METODA *IN VITRO*

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

B.47. METODA ISPITIVANJA ZAMUĆENJA I PROPUSNOSTI GOVEĐE ROŽNICE ZA UTVRĐIVANJE I. KEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I II. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

B.48. METODA ISPITIVANJA NA IZOLIRANOM PILEĆEM OKU ZA UTVRĐIVANJE I. KEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I II. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

B.49. *IN VITRO* MIKRONUKLEUS-TEST NA STANICAMA SISAVACA

B.50. PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA: DA

B.51. PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA: BrdU-ELISA

B.52. AKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST - METODA AKUTNOG TOKSIČNOG RAZREDA

B.53. STUDIJA RAZVOJNE NEUROTOKSIČNOSTI

B.54. UTEROTROPNI BIOTEST KOD GLODAVACA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA NA ESTROGENSKA SVOJSTVA

B.55. HERSHBERGEROV BIOTEST NA ŠTAKORIMA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA ZA (ANTI)ANDROGENA SVOJSTVA

B.56. PRODULJENA STUDIJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA JEDNOJ GENERACIJI

B.57. TEST STEROIDOGENEZE H295R

B.58. TRANSGENSKE ANALIZE MUTACIJE GENA SOMATSKIH I SPOLNIH STANICA GLODAVACA

B.59. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN CHEMICO:* TEST IZRAVNE REAKTIVNOSTI PEPTIDA (*DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY* – DPRA)

B.60. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO:* TEST LUCIFERAZE ARE-NRF2

B.61. METODA ISPITIVANJA PROPUŠTANJA FLUORESCEINA ZA IDENTIFIKACIJU TVARI NAGRIZAJUĆIH I JAKO NADRAŽUJUĆIH ZA OČI

B.62. *IN VIVO* ALKALNI KOMET-TEST NA STANICAMA SISAVACA

▼B

B.63. TEST PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

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

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

B.66. *IN VITRO* TESTOVI TRANSAKTIVACIJE SA STABILNOM TRANSFEKCIJOM ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKIH RECEPTORA

B.67. *IN VITRO* ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA ZA TIMIDIN KINAZU

B.68. IN VITRO ISPITNA METODA S KRATKIM VREMENOM IZLAGANJA ZA UTVRĐIVANJE: i. KEMIKALIJA KOJE INDUCIRAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I ii. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

B.69. ISPITNA METODA REKONSTRUIRANOG EPITELA KOJI NALIKUJE LJUDSKOJ ROŽNICI (RhCE) ZA UTVRĐIVANJE KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

B.70. *IN VITRO* TESTOVI LJUDSKOG REKOMBINANTNOG ESTROGENSKOG RECEPTORA (hrER) ZA OTKRIVANJE KEMIKALIJA S AFINITETOM VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR

B.71. *IN VITRO* TESTOVI IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE KOJIMA SE ISPITUJE KLJUČNI DOGAĐAJ AKTIVIRANJA DENDRITIČNIH STANICA U PUTU NASTANKA ŠTETNOG ISHODA (AOP) IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE

▼B

OPĆI UVOD

A. KARAKTERIZACIJA ISPITIVANE TVARI

Prije početka bilo kakve studije toksičnosti treba biti poznat sastav ispitivane tvari, uključujući glavne nečistoće, te njezina relevantna fizikalno-kemijska svojstva koja uključuju i stabilnost.

Fizikalno-kemijska svojstva ispitivane tvari osiguravaju važne informacije za odabir puta primjene, planiranje studije, te rukovanje ispitivanim tvarima i njihovo pohranjivanje.

Početku studije mora prethoditi razvijanje analitičke metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje ispitivane tvari (uključujući glavne nečistoće kada je moguće) u sredstvu za doziranje i biološkom materijalu.

Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sve informacije vezane uz identifikaciju, fizikalno-kemijska svojstva, čistoću i ponašanje ispitivane tvari.

B. ZAŠTITA ŽIVOTINJA

Kod ispitivanja toksičnosti bitna je stroga kontrola okolišnih uvjeta i pravilne metode zaštite životinja.

i. *Smještajni uvjeti*

Okolišni uvjeti u prostorijama i ograđenim prostorima za držanje pokusnih životinja moraju odgovarati vrsti kojoj one pripadaju. Za štakore, miševe i zamorce odgovarajući su uvjeti sobna temperatura od 22 °C ± 3 °C uz relativnu vlažnost zraka od 30 do 70 %; za kuniće temperatura treba biti 20 °C ± 3 °C uz relativnu vlažnost zraka od 30 do 70 %.

Neke pokusne tehnike posebno su osjetljive na djelovanje temperature i u takvim su slučajevima pojedinosti o odgovarajućim uvjetima uključeni u opis ispitne metode. Pri svim istraživanjima toksičkih učinaka temperaturu i vlažnost zraka treba pratiti, bilježiti i uključiti u završno izvješće o studiji.

Osvjetljenje treba biti umjetno i mora se u slijedu izmjenjivati 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Pojedinosti o svjetlosnom režimu treba zabilježiti i uključiti u završno izvješće o studiji.

Ako u metodi nije predviđeno drugačije, životinje mogu biti smještene pojedinačno ili se u kavezima mogu držati u malim skupinama istog spola; u slučaju skupnog smještaja, u jedan kavez ne smije se staviti više od pet životinja.

U izvješćima o pokusima na životinjama važno je navesti tip kaveza i broj životinja smještenih u svakom kavezu za vrijeme izloženosti kemikaliji, kao i tijekom opažanja koje slijedi nakon toga.

▼B

ii. *Prehrambeni uvjeti*

Prehrana treba zadovoljavati sve nutritivne zahtjeve životinjske vrste koja se koristi u ispitivanju. Kad se ispitivane tvari životinjama daju u hrani, nutritivna se vrijednost može sniziti međusobnim djelovanjem ispitivane tvari i nekog prehrambenog sastojka. Pri tumačenju rezultata ispitivanja treba uzeti u obzir mogućnost takve reakcije. Može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine vode za piće. Kad se ispitivana tvar primjenjuje ovom metodom, na izbor hrane može utjecati potreba da se u toj hrani osigura odgovarajuća primjesa ispitivane tvari.

Prehrambeni kontaminanti za koje se zna da utječu na toksičnost ne smiju biti prisutni u koncentracijama u kojima bi utjecali na rezultate.

C. **ALTERNATIVNA ISPITIVANJA**

Europska unija obvezala se promicati razvoj i validaciju alternativnih tehnika koje mogu osigurati jednaku razinu informacija kao i testovi koji se sada obavljaju na životinjama, ali se pri njihovoj primjeni koristi manji broj životinja, uzrokuje manje patnje ili se u potpunosti izbjegava korištenje životinja.

Kad takve metode postanu dostupne, kad god je moguće mora se razmotriti mogućnost njihove primjene pri karakterizaciji opasnosti na kojoj se temelji klasifikacija kemikalija, označivanje kemikalija s obzirom na intrinzičke opasnosti te procjena njihove sigurnosti.

D. **OCJENA I TUMAČENJE REZULTATA**

Kod ocjenjivanja i tumačenja rezultata ispitivanja obvezno treba uzeti u obzir granice do kojih se rezultati studija na životinjama i studija *in vitro* mogu izravno ekstrapolirati na čovjeka, pa se prema tome dokazi o štetnom djelovanju na ljude, kada su dostupni, mogu upotrijebiti za potvrdu rezultata ispitivanja.

E. **REFERENTNA LITERATURA**

Većina navedenih metoda razvijena je u okviru programa OECD-a za Smjernice za ispitivanja i treba ih primjenjivati u skladu s načelima dobre laboratorijske prakse, kako bi se osiguralo što je moguće šire „međusobno prihvaćanje podataka”.

Dodatne informacije mogu se naći u referencama navedenim u OECD-ovim smjernicama i drugdje objavljenoj relevantnoj literaturi.

▼B

B.1 bis. **AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA S FIKSNOM DOZOM**

1. **METODA**

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 420 (2001.)

1.1. UVOD

Kod tradicionalnih metoda za ocjenjivanje akutne toksičnosti, smrt životinje predstavlja krajnji toksički učinak. 1984. Britansko toksikološko društvo predložilo je novi pristup ispitivanju akutne toksičnosti koji se temelji na primjeni niza fiksnih doza (1). Ovaj pristup nije uključivao smrt životinje kao krajnju točku toksičkog učinka već se umjesto toga temeljio na jasnim znakovima toksičnosti kod primjene jedne od niza fiksnih doza. Nakon britanskih (2) i međunarodnih (3) validacijskih studija *in vivo*, postupak je 1992. prihvaćen kao ispitna metoda. Kasnije su vrednovana statistička svojstva postupka s fiksnim dozama pomoću matematičkih modela upotrijebljenih u nizu studija (4)(5)(6). I modelske studije i studije *in vivo* pokazale su da je postupak ponovljiv, da je za njegovu primjenu potreban manji broj životinja, da uzrokuje manje trpljenja nego tradicionalne metode, te da omogućuje rangiranje tvari na sličan način kao i druge razvijene metode za ispitivanje akutne toksičnosti.

Upute za odabir najprikladnije ispitne metode za određenu namjenu mogu se naći u Smjernicama za ispitivanje akutne oralne toksičnosti (7). Ovaj dokument isto tako sadrži dodatne informacije o primjeni i tumačenju ispitne metode B.1*bis*.

Načelo ove metode je da se u glavnoj studiji koriste samo blago toksične doze, a da se izbjegava primjena doza za koje se pretpostavlja da bi mogle biti smrtonosne. Isto tako ne treba primjenjivati doze koje uzrokuju znatnu bol ili stres kod životinja zbog nagrizajućeg ili jakog nadražujućeg djelovanja. Životinje koje su na umoru ili životinje koje očito trpe intenzivnu bol ili pokazuju znakove jakog i dugotrajnog stresa humano se usmrćuju, a pri tumačenju rezultata ispitivanja tretiraju se jednako kao i životinje koje su uginule tijekom ispitivanja. Kriteriji za donošenje odluke o usmrćivanju životinja koje su na umoru ili jako trpe i smjernice za prepoznavanje simptoma predvidive ili neminovne smrti navedeni su u zasebnom dokumentu (8).

Ova metoda osigurava podatke o opasnim svojstvima i omogućuje rangiranje i klasifikaciju tvari prema Globalno usklađenom sustavu (GHS) za klasifikaciju kemikalija koje uzrokuju akutnu toksičnost (9).

Prije početka studije ispitni laboratorij treba razmotriti sve raspoložive podatke o ispitivanoj tvari. Ti podaci uključuju identitet i kemijsku strukturu tvari; njezina fizikalno-kemijska svojstva; rezultate drugih toksikoloških ispitivanja *in vitro* ili *in vivo* obavljenih na toj tvari; toksikološke podatke o tvarima koje su joj srodne po strukturi; kao i predviđenu primjenu tvari. Ovi su podaci neophodni kako bi se svim zainteresiranim stranama dokazalo da je ispitivanje važno za zaštitu ljudskog zdravlja, te će pomoći u odabiru odgovarajuće početne doze.

▼B

1.2. DEFINICIJE

Akutna oralna toksičnost: odnosi se na štetne učinke koji se javljaju nakon primjene jedne doze ispitivane tvari ili nakon nekoliko doza danih unutar 24 sata.

Odgođena smrt: znači da unutar 48 sati životinja ne ugine niti pokazuje znakove umiranja, već ugine kasnije tijekom 14-dnevnog razdoblja opažanja.

Doza: količina ispitivane tvari koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane tvari po jedinici mase pokusne životinje (mg/kg).

Evidentna toksičnost: opći naziv koji opisuje jasne znakove toksičnosti nakon primjene ispitivane tvari (vidjeti (3) za primjere) koji su takvi da se kod sljedeće više fiksne doze kod većine životinja može očekivati ili jaka bol i trajni znaci jakog stresa, stanje umiranja (kriteriji su prikazani u Smjernicama za humano usmrćivanje (8)), ili vjerojatna smrt.

GHS: Globalno usklađeni sustav klasifikacije kemijskih tvari i mješavina. Zajednički projekt OECD-a (ljudsko zdravlje i okoliš), UN-ovog Odbora stručnjaka za prijevoz opasnih tereta (fizikalno-kemijska svojstva), te ILO-a (obavještavanje o opasnostima), koordiniran Međuorganizacijskim programom za pravilno rukovanje kemikalijama (IOMC).

Neminovna smrt: kad se stanje umiranja ili smrt životinje očekuje prije idućeg planiranog vremena opažanja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodavaca uključuju grčeve, bočni položaj, ležanje i drhtavicu. (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (8)).

LD_{50} (srednja smrtonosna doza): statistički određena jednokratna doza tvari za koju se očekuje da će kod 50 posto životinja izazvati smrt ako se primjeni oralnim putem. Vrijednost LD_{50} izražava se kao masa ispitivane tvari po jedinici mase pokusne životinje (mg/kg).

Granična doza: odnosi se na gornju graničnu dozu koja se primjenjuje u ispitivanju (2 000 ili 5 000 mg/kg).

Stanje umiranja: kad je životinja na umoru, odnosno kad ne bi mogla preživjeti čak ni da se liječi. (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (8)).

Predvidiva smrt: prisutnost kliničkih znakova koji pokazuju da će smrt nastupiti u znanom budućem vremenu prije planiranog kraja pokusa, na primjer: nesposobnnost životinje da dosegne vodu ili hranu. (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (8)).

▼B

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Na skupine životinja istog spola postupno se primjenjuju fiksne doze od 5, 50, 300 i 2 000 mg/kg (iznimno može doći u obzir i primjena dodatne fiksne doze od 5 000 mg/kg, vidjeti odjeljak 1.6.2). Početna doza odabire se na temelju prethodnih opažanja kao doza za koju se očekuje da će uzrokovati pojavu nekih znakova toksičnosti, ali neće izazvati jaki toksički učinak ili smrtnost. Klinički znakovi i stanja uz koja je vezana izrazita bol, trpljenje i neminovna smrt životinje detaljno su opisani u posebnim Smjernicama OECD-a (8). Na sljedeće skupine životinja mogu se primjenjivati više ili niže fiksne doze, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti znakova toksičnsti ili smrtnosti. Ovaj se postupak nastavlja sve dok se ne utvrdi doza koja uzrokuje evidentnu toksičnost ili najviše jednu smrt, odnosno dok se ne utvrdi da nakon primjene najviše doze nema vidljivih toksičkih učinaka, ili pak da najniža doza uzrokuje smrt.

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Odabir životinjske vrste**

Najčešće korištena vrsta glodavaca je štakor, iako se mogu koristiti i neke druge vrste. Uobičajeno je koristiti ženke (7). Razlog je tome što je pretraživanjem literature o uobičajenim testovima u kojima se primjenjuje LD_{50} utvrđeno da razlike u osjetljivosti spolova gotovo da i nema, ali u slučajevima gdje su razlike opažene, ženke općenito pokazuju nešto veću osjetljivost (10). Međutim, ako saznanja o toksikološkim ili toksikokinetičkim svojstvima strukturno srodnih kemikalija ukazuju na to da bi osjetljiviji mogli biti mužjaci, treba koristiti mužjake. Ako se ispitivanja provode na mužjacima, potrebno je navesti razloge za to.

U ispitivanjima treba koristiti zdrave mlade odrasle primjerke životinja koje pripadaju najčešće korištenim sojevima laboratorijskih životinja. Treba koristiti ženke koje nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na početku primjene doze svaka životinja treba biti između 8 i 12 tjedana starosti, a njezina masa treba biti u okviru ± 20 % srednje mase životinja kojima je tvar bila dozirana u prijašnjim ispitivanjima.

1.4.2. **Uvjeti držanja i hranjenja životinja**

Temperatura prostorije za držanje pokusnih životinja treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako relativna vlažnost zraka treba biti najmanje 30 % i po mogućnosti ne više 70 %, osim za vrijeme čišćenja prostorije, treba je nastojati održavati na 50-60 %. Osvjetljenje treba biti umjetno i mora se u slijedu izmjenjivati 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Što se tiče hranjenja, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine pitke vode. Životinje se mogu u kavezima držati skupno, razvrstane prema dozama, s tim da broj životinja koje se drže u jednom kavezu ne smije ometati nesmetano opažanje svake životinje.

1.4.3. **Priprema životinja**

Životinje se odabiru nasumce, označavaju se kako bi se mogle pojedinačno razlikovati i drže u kavezima barem 5 dana prije početka primjene doza kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

▼B

1.4.4. **Priprema doza**

Općenito, ispitivane tvari treba primjenjivati u rasponu doza jednakog volumena, a mijenjati treba koncentraciju pripravka koji se dozira. Međutim, pri ispitivanju nekog tekućeg krajnjeg proizvoda ili mješavine, za kasniju ocjenu opasnosti ispitivane tvari može biti relevantnija primjena te tvari u nerazrijeđenom obliku, tj. pri stalnoj koncentraciji, što neka regulatorna tijela postavljaju kao zahtjev. U svakom slučaju ne smije se prekoračiti maksimalni volumen doze određene za primjenu. Maksimalni volumen tekućine koji se smije odjednom primijeniti ovisi o veličini pokusne životinje. Kod glodavaca, taj volumen obično ne smije biti veći od 1ml/100 g mase životinje: međutim, u slučaju primjene vodenih otopina može doći u obzir i doza od 2 ml/100 g mase životinje. Što se tiče formulacije pripravka koji se dozira, gdje god je moguće preporuča se upotreba vodene otopine/suspenzije/emulzije, a tek onda, po prioritetnom redoslijedu, uljne otopine/suspenzije/emulzije (npr. kukuruzno ulje) ili otopine za koje se koriste drugi nosači. Za sve nosače, osim vode, moraju biti poznata njihova toksikološka svojstva. Doze se moraju pripremati neposredno prije primjene, osim ako se radi o pripravku za koji se zna da će tijekom upotrebe zadržati prihvatljivu stabilnost.

1.5. POSTUPAK

1.5.1. **Primjena doza**

Ispitivana se tvar primjenjuje u jednoj dozi oralnom intubacijom pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. U izvanrednim okolnostima, kada jednokratna primjena doze nije moguća, jedna se doza može dati i u nekoliko manjih dijelova tijekom vremenskog razdoblja ne dužeg od 24 sata.

Prije primjene doza životinje trebaju postiti (npr. u slučaju štakora, hranu, ali ne i vodu treba uskratiti preko noći; kod miševa, hranu, ali ne i vodu treba uskratiti na 3-4 sata). Nakon posta životinje treba izvagati te primijeniti ispitivanu tvar. Nakon što se tvar primijeni, hrana se može uskratiti sljedeća 3-4 sata kad su u pitanju štakori ili 1-2 sata kad se radi o miševima. U slučajevima kad se doza primjenjuje u nekoliko manjih dijelova kroz određeno vremensko razdoblje, ovisno o dužini tog razdoblja, moguće je da će životinjama trebati dati hranu i vodu.

1.5.2. **Inicijalna studija**

Svrha inicijalne studije je odabiranje odgovarajuće početne doze za glavnu studiju. Ispitivana tvar se primjenjuje na pojedinačne životinje po redoslijedu prikazanom u dijagramu toka u Dodatku 1. Inicijalna studija završava kada je moguće odrediti početnu dozu (ili ako dođe do smrtnog ishoda već kod najniže fiksne doze).

Početna doza za inicijalnu studiju odabire se među fiksnim koncentracijama od 5, 50, 300 i 2 000 mg/kg kao doza za koju se očekuje da će izazvati evidentnu toksičnost na temelju dokaza koje, ako je moguće, treba temeljiti na podacima dobivenim ispitivanjima iste kemikalije ili strukturno srodnih kemikalija *in vivo* i *in vitro*. Ako takvih informacija nema, za početnu dozu uzima se koncentracija od 300 mg/kg.

Između doza koje se primjenjuju na pojedinačne životinje treba napraviti pauzu od najmanje 24 sata. Životinje treba opažati najmanje 14 dana.

▼B

Iznimno, i samo u slučajevima kad je to opravdavano posebnim regulatornim potrebama, može se razmotriti primjena dodatne, više fiksne doze od 5 000 mg/kg (vidjeti Dodatak 3). Zbog brige o dobrobiti životinja, ispitivanje na životinjama u okviru GHS kategorije 5 (2 000-5 000 mg/kg) ne preporuča se i može doći u obzir samo u slučajevima kad postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti od neposrednog značaja za zaštitu ljudskog zdravlja, zdravlja životinja, ili za zaštitu okoliša.

U slučajevima kad u okviru inicijalne studije pokusna životinja ugine već kod primjene najniže fiksne doze (5 mg/kg), uobičajeni je postupak da se studija prekine, a ispitivana tvar svrsta u GHS kategoriju 1 (kako je prikazano u Dodatku 1). Međutim, ako je za ovakvu klasifikaciju potrebna dodatna potvrda, može se provesti još jedno dodatno neobvezno ispitivanje, na sljedeći način. Doza od 5 mg/kg primijeni se na još jednu životinju. Ako i ta druga životinja ugine, GHS kategorija 1 se potvrđuje i studija se odmah prekida. Ako druga životinja preživi, doza od 5 mg/kg primjenjuje se na još najviše tri životinje. Zbog visokog stupnja opasnosti od smrtnosti, doza se primjenjuje u slijedu na jednu po jednu životinju, radi zaštite njihove dobrobiti. Vremenski interval između davanja doze svakoj životinji treba biti dovoljno dug da se utvrdi vjerojatnost da će prethodna životinja preživjeti. Ako se dogodi i druga smrt, slijed davanja odmah se prekida i doza se više ne smije primijeniti niti na jednu životinju. Budući da pojava drugog smrtnog slučaja (bez obzira na broj životinja koje se testiraju u vrijeme prekida) spada pod ishod A (dvije ili više smrti) za fiksnu dozu od 5 mg/kg primjenjuje se pravilo klasifikacije iz Dodatka 2. (kategorija 1 u slučaju dviju ili više smrti ili kategorija 2 u slučaju najviše jedne smrti). Osim toga, u Dodatku 4. dane su smjernice za klasificiranje u sustavu EU-a dok se ne počne primjenjivati novi GHS.

1.5.3. **Glavna studija**

1.5.3.1. *Broj životinja i visina doza*

Na dijagramu toka u Dodatku 2. prikazano je kako nastaviti s ispitivanjem nakon primjene prve fiksne doze. Treba poduzeti jedan od tri koraka: prekinuti ispitivanje i ispitivanu tvar svrstati u odgovarajuću klasu opasnih tvari, nastaviti ispitivanje s višom fiksnom dozom, ili nastaviti ispitivanje s nižom fiksnom dozom. Međutim, radi zaštite životinja, doza koja je u inicijalnoj studiji uzrokovala smrt životinje u glavnoj se studiji neće primjenjivati (vidjeti Dodatak 2). Iskustvo pokazuje da će najvjerojatniji ishod ispitivanja s početnom dozom biti takav da će se tvar moći klasificirati i da daljnja ispitivanja neće biti potrebna.

Za svaku visinu doze koja se ispituje obično se koristi po pet životinja istog spola. Na tu skupinu od pet životinja, koju čini jedna životinja korištena u inicijalnoj studiji i još četiri životinje, primjenjuje se odabrana doza (osim u slučajevima kad neka doza koja se koristi u glavnoj studiji nije bila korištena u inicijalnoj studiji, što nije uobičajeno).

Vremenski interval između primjene doza različitih visina određuje se prema početku, trajanju i jačini znakova toksičnosti. Tretiranje životinja sljedećom dozom treba odgoditi dok se ne utvrdi sigurno preživljavanje svih životinja na koje je primijenjena prethodna doza. Preporuča se da između primjene dvije različite doze prođe tri ili četiri dana, prema potrebi, kako bi se mogli uočiti odgođeni simptomi toksičnosti. Taj se vremenski interval može prilagođavati prema potrebi, npr. u slučaju reakcije na temelju koje se ne može donijeti zaključak.

▼B

Kad se razmatra primjena gornje fiksne doze od 5 000 mg/kg, treba slijediti postupak opisan u Dodatku 3. (vidjeti također odjeljak 1.6.2.).

1.5.3.2. *Granični test*

Granični se test prvenstveno koristi u situacijama kad izvoditelj ispitivanja ima informacije koje kazuju da ispitivani materijal vjerojatno nije toksičan, tj. da postaje toksičan samo iznad regulatornih graničnih doza. Informacije o toksičnosti ispitivanog materijala mogu se temeljiti na saznanjima o sličnim ispitanim spojevima ili sličnim ispitanim mješavinama ili proizvodima, uzimajući u obzir identitet i postotak komponenata za koje se zna da su toksikološki značajne. U situacijama kad podataka o toksičnosti ima malo ili ih uopće nema, ili kad se očekuje da će ispitivani materijal biti toksičan, treba obaviti glavni test.

Kao granični test u okviru ovih smjernica primjenjuje se uobičajeni postupak, odnosno primjena početne doze za inicijalnu studiju od 2 000 mg/kg (ili, iznimno, 5 000 mg/kg) iza čega slijedi primjena jednako visoke doze na još četiri životinje.

1.6. OPAŽANJA

Nakon primjene doze životinje se pojedinačno opažaju barem jedanput tijekom prvih 30 minuta, povremeno tijekom prva 24 sata, uz posebnu pozornost tijekom prva 4 sata, a zatim jednom dnevno u trajanju od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno izlučiti iz studije i humano usmrtiti zbog njezine dobrobiti ili ako se utvrdi smrt životinje. Međutim, trajanje opažanja ne bi smjelo biti strogo određeno. Treba ga utvrditi na temelju toksičkih reakcija, početka i trajanja oporavka i prema potrebi ga se može produžiti. Važno je vrijeme pojave i nestajanja prvih znakova toksičnosti, posebno ako postoji tendencija da se znakovi toksičnosti pojave s odgodom (11). Svi rezultati opažanja sustavno se bilježe, pri čemu se za svaku životinju vodi posebna evidencija.

Dodatna opažanja bit će potrebna ako životinje nastave pokazivati znakove toksičnosti. Treba opažati promjene na koži i dlaci, očima i sluznicama, na dišnom i cirkulacijskom sustavu, te na autonomnom i centralnom živčanom sustavu, kao i promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i obrascu ponašanja. S posebnom pozornošću treba opažati drhtavicu, grčeve, slinjenje, proljev, otupjelost, san i komu. Treba poštovati načela i kriterije navedene u Smjernicama za humano usmrćivanje (8). Životinje za koje se utvrdi da su u stanju umiranja i životinje koje pokazuju da trpe jake bolove ili dugotrajni stres treba humano usmrtiti. U slučajevima kad se životinja usmrćuje iz humanih razloga, ili se utvrdi njezina smrt, vrijeme smrti treba što točnije zabilježiti.

1.6.1. **Tjelesna masa**

Pojedinačnu masu životinja treba utvrditi neposredno prije primjene ispitivane tvari, a nakon tog najmanje jednom tjedno. Promjene u masi treba izračunati i zabilježiti. Na kraju ispitivanja preživjele se životinje izvažu i potom humano usmrte.

▼B

1.6.2. **Patologija**

Sve pokusne životinje (uključujući i one koje uginu za vrijeme ispitivanja ili ih se izluči iz studije zbog zaštite dobrobiti životinja) treba podvrgnuti obdukciji. Za svaku životinju treba zabilježiti sve veće patološke promjene. Treba razmotriti i mogućnost obavljanja mikroskopskog pregleda organa životinja koje su nakon primjene prve doze preživjele 24 ili više sati i na kojima su obdukcijom utvrđene velike patološke promjene, budući da se na taj način mogu prikupiti korisne informacije.

2. **PODACI**

Treba prikupiti podatke o svakoj pojedinačnoj životinji. Osim toga, sve podatke treba rezimirati u obliku tablice u kojoj će za svaku ispitnu skupinu biti naveden broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje su pokazale znakove toksičnosti, broj životinja kod kojih je tijekom ispitivanja utvrđena smrt ili su iz humanih razloga bile usmrćene, vrijeme smrti svake pojedinačne životinje, te opis i vremenski tijek toksičkih učinaka i reverzibilnosti, kao i nalazi obdukcije.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije, prema potrebi:

ispitivana tvar:

— fizikalni oblik, čistoća i, tamo gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući izomerizaciju),

— identifikacijski podaci, uključujući CAS broj.

Nosač (prema potrebi):

— obrazloženje za odabir nosača, ako se ne radi o vodi.

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta/soj,

— mikrobiološki status životinje, ako je poznat,

— broj, starost i spol životinja (uključujući, prema potrebi, razloge za korištenje mužjaka umjesto ženki),

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.

Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari, uključujući pojedinosti o fizikalnom obliku primijenjenog materijala,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari koji uključuju volumene doza i vrijeme njihove primjene,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući pojedinosti o vrsti i izvoru vode),

— obrazloženje za odabir početne doze.

▼B

Rezultati:

— tablični prikaz podataka o reakcijama i visini doza za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti, uključujući smrtnost, te prirodu, jačinu i trajanje toksičkog učinka),

— tablični prikaz tjelesne mase i promjena u tjelesnoj masi,

— masa pojedinačnih životinja na dan primjene doze, zatim u tjednim intervalima, te u vrijeme smrti ili usmrćivanja,

— datum i vrijeme smrti, ako do nje dođe prije planiranog usmrćivanja,

— vrijeme pojavljivanja znakova toksičnosti i jesu li ti znakovi bili reverzibilni kod svake životinje,

— nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju, ako su dostupni.

Diskusija i tumačenje rezultata.

Zaključci.

4. **REFERENCE:**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984) Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, str. 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O (1987) Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, str. 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P (1990) The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, str. 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N (1992) Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, str. 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A (1995) Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, str. 315-323.

(6) Stallard, N., Whitehead, A and Ridgeway, P. (2002) Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, str. 183-196.

(7) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris

(8) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment No 19.

▼B

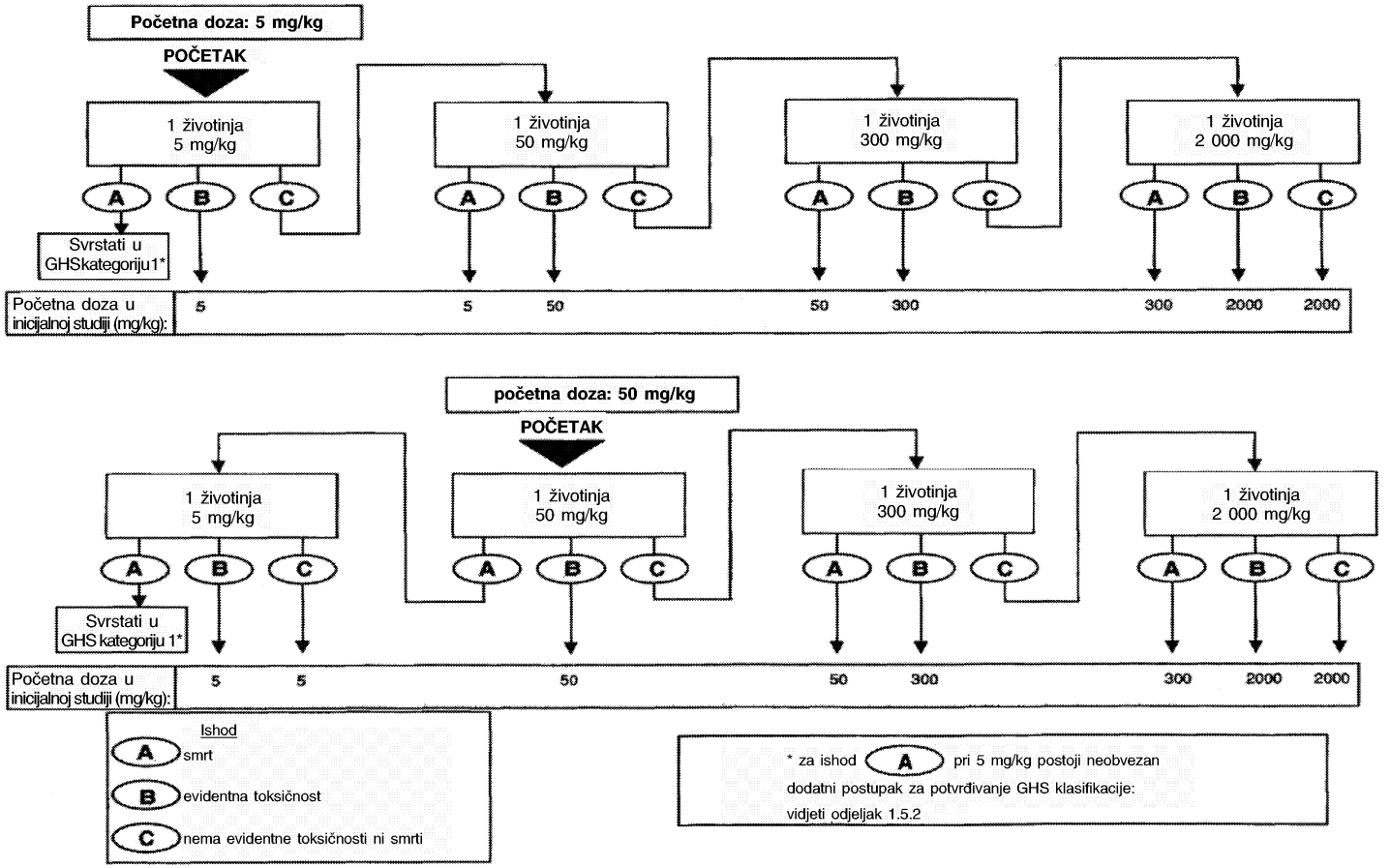
(9) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, str. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/ home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C (1995) Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, str. 223-231.

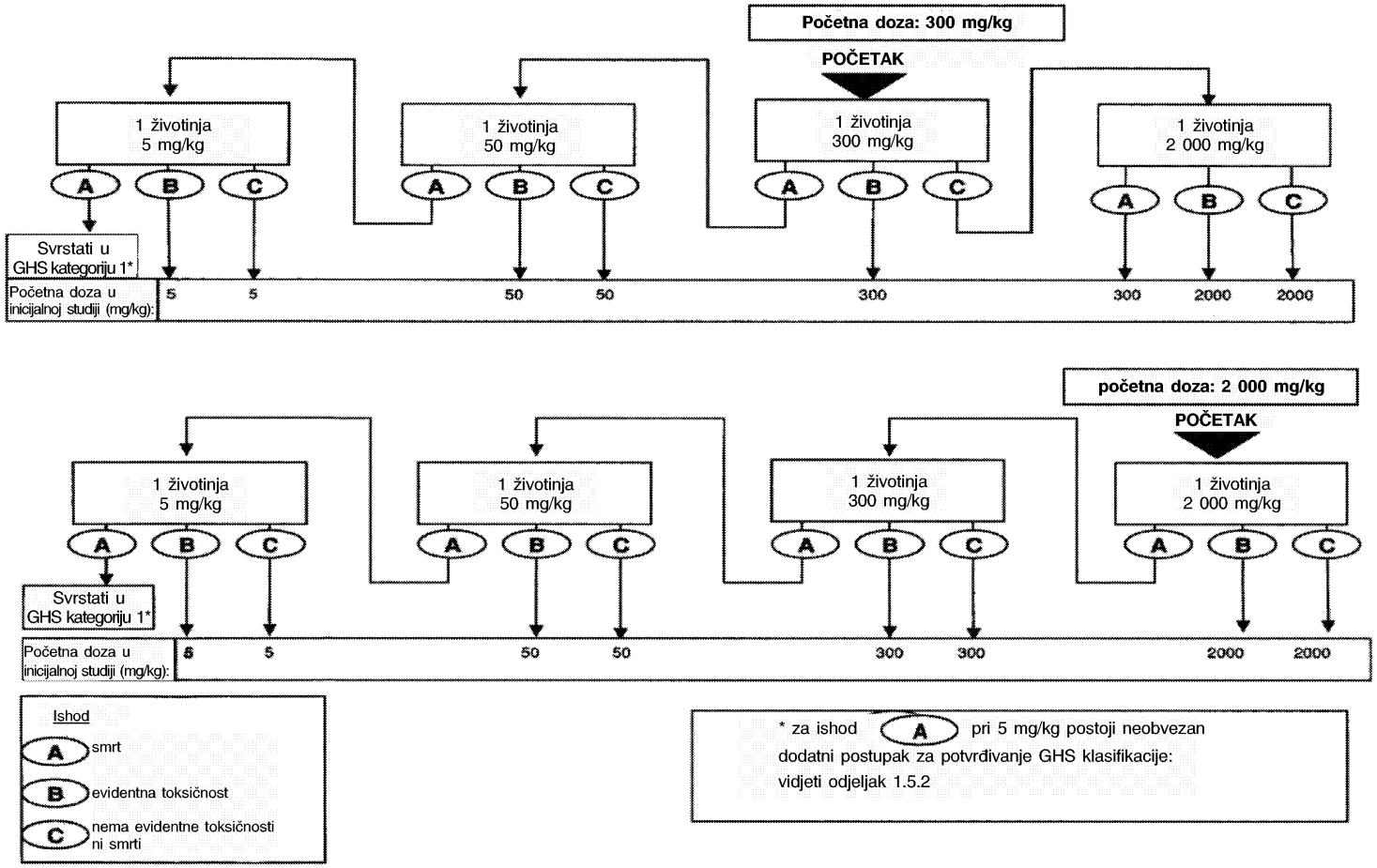
(11) Chan P.K and A. W Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd. New York, USA.

Dodatak 1.

DIJAGRAM TOKA ZA INICIJALNU STUDIJU



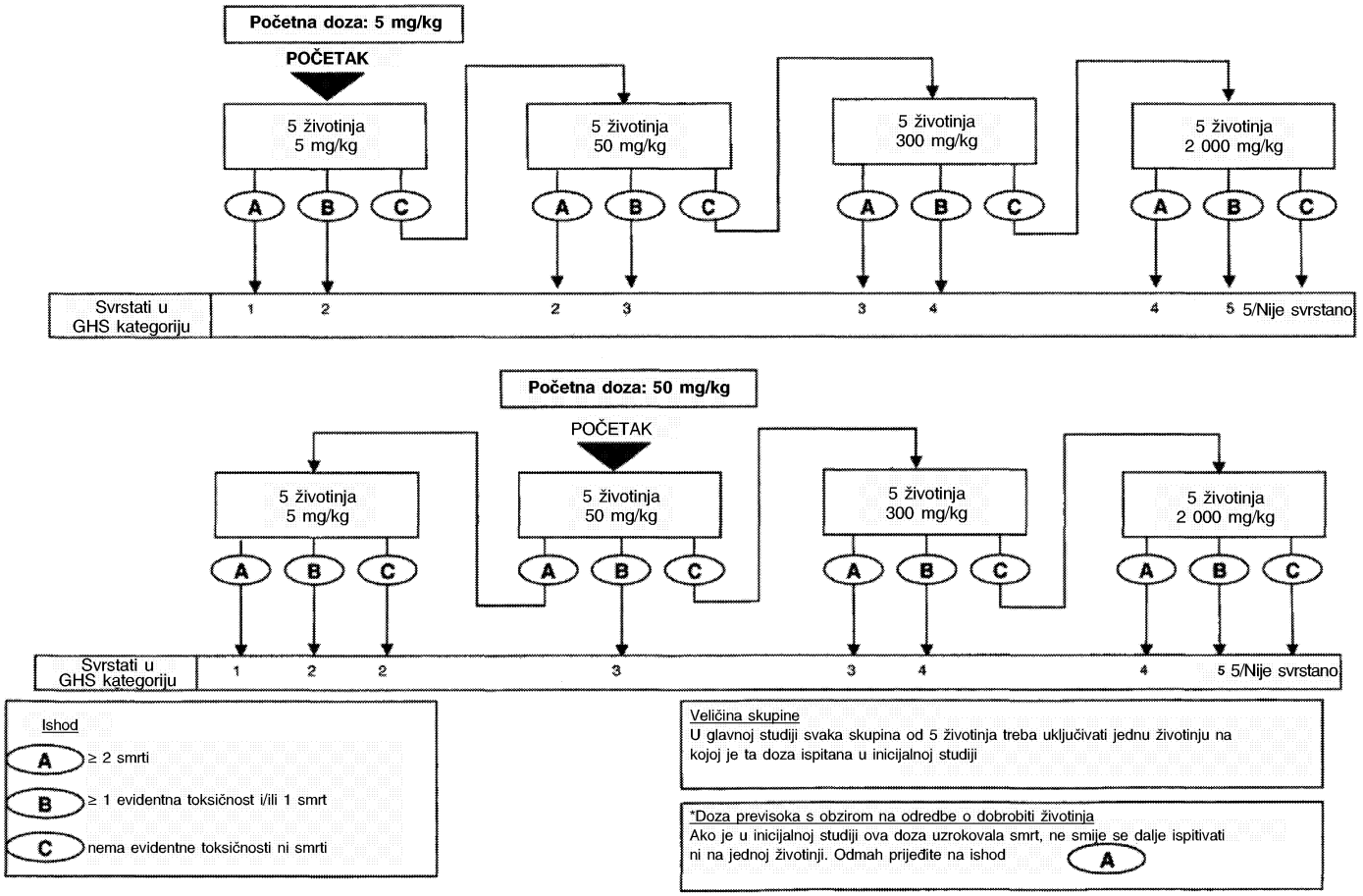
▼B


Početna doza: 300 mg/kg
POČETAK
1 životinja 5 mg/kg
1 životinja 50 mg/kg
1 životinja 300 mg/kg
1 životinja 2 000 mg/kg
A
B
C
Svrstati u GHS kategoriju 1*
Početna doza u inicijalnoj studiji (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
početna doza: 2 000 mg/kg
POČETAK
1 životinja 5 mg/kg
1 životinja 50 mg/kg
1 životinja 300 mg/kg
1 životinja 2 000 mg/kg
Svrstati u GHS kategoriju 1*
Početna doza u inicijalnoj studiji (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Ishod
A smrt
B evidentna toksičnost
C nema evidentne toksičnosti ni smrti
* za ishod A pri 5 mg/kg postoji neobvezan dodatni postupak za potvrđivanje GHS klasifikacije: vidjeti odjeljak 1.5.2

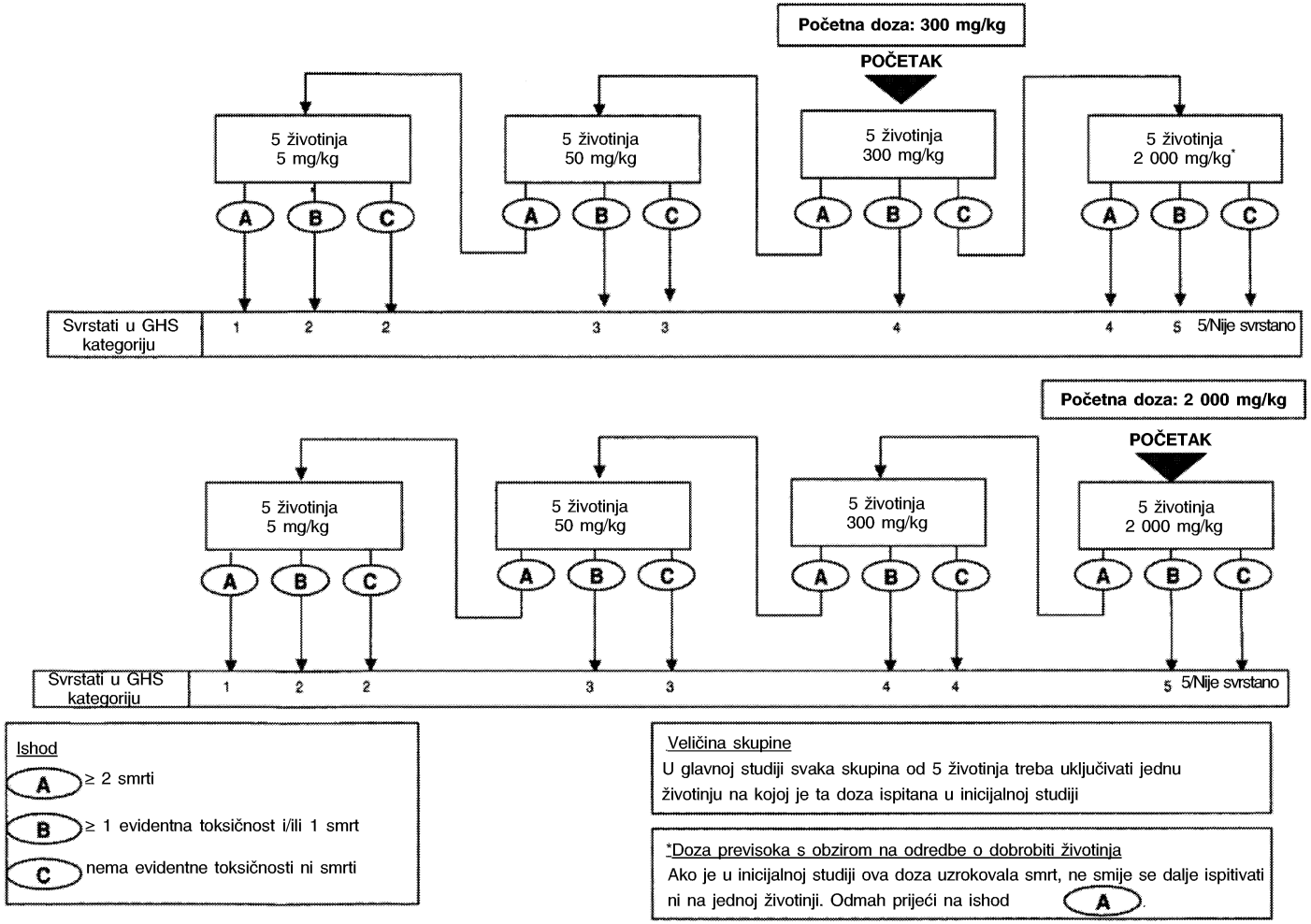
▼B

Dodatak 2

DIJAGRAM TOKA ZA GLAVNU STUDIJU



▼B


Početna doza: 300 mg/kg
POČETAK
5 životinja 5 mg/kg
5 životinja 50 mg/kg
5 životinja 300 mg/kg
5 životinja 2 000 mg/kg*
A B C
Svrstati u GHS kategoriju
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Nije svrstano
Početna doza: 2 000 mg/kg
POČETAK
5 životinja 5 mg/kg
5 životinja 50 mg/kg
5 životinja 300 mg/kg
5 životinja 2 000 mg/kg
A B C
Svrstati u GHS kategoriju
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Nije svrstano
Ishod
A ≥ 2 smrti
B ≥ 1 evidentna toksičnost i/ili 1 smrt
C nema evidentne toksičnosti ni smrti
Veličina skupine
U glavnoj studiji svaka skupina od 5 životinja treba uključivati jednu životinju na kojoj je ta doza ispitana u inicijalnoj studiji
*Doza previsoka s obzirom na odredbe o dobrobiti životinja
Ako je u inicijalnoj studiji ova doza uzrokovala smrt, ne smije se dalje ispitivati ni na jednoj životinji. Odmah prijeći na ishod A.

▼B

Dodatak 3.

KRITERIJI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH TVARI ČIJA JE OČEKIVANA VRIJEDNOST LD_{50} VIŠA OD 2 000 MG/KG BEZ POTREBE ZA ISPITIVANJEM

Kriteriji za kategoriju opasnosti 5 omogućuju identifikaciju ispitivanih tvari relativno niske akutne toksičnosti koje, međutim, u određenim uvjetima mogu predstavljati opasnost za osjetljive populacije. Pretpostavlja se da ove tvari imaju oralnu ili dermalnu vrijednost LD_{50} u rasponu od 2 000-5 000 mg/kg ili ekvivalentne vrijednosti za druge puteve primjene. Ispitivane tvari mogu se svrstati u kategoriju opasnosti koju definira: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategorija 5 u GHS-u) u sljedećim slučajevima:

(a) ako na ovu kategoriju upućuje bilo koja od ispitnih shema iz Dodatka 2., na temelju incidencije smrtnosti;

(b) ako već postoje pouzdani dokazi koji pokazuju da je LD_{50} u okvirima vrijednosti koje odgovaraju kategoriji 5; ili ako druge toksikološke studije provedene na životinjama ili toksičko djelovanje na ljude izazivaju zabrinutost za ljudsko zdravlje;

(c) ako ekstrapolacija, procjena ili prosudba podataka ne opravdavaju svrstavanje u višu klasu opasnosti; i

— ako postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajno toksičko djelovanje na ljude, ili

— ako se pri ispitivanju do razine vrijednosti kategorije 4, uz oralnu primjenu, zabilježi smrtnost, ili

— ako se stručnom procjenom pri ispitivanju do razine vrijednosti za kategoriju 4 potvrde značajni klinički znakovi toksičnosti koji ne uključuju proljev, piloerekciju (naježenost dlake) ili neuredan izgled, ili

— ako se stručnom procjenom, koja se temelji na drugim studijama na životinjama, potvrde pouzdane informacije koje ukazuju na mogućnost značajnog akutnog djelovanja.

ISPITIVANJA UZ PRIMJENU DOZA IZNAD 2 000 MG/KG

Iznimno, i samo u slučajevima kad je to opravdano zbog posebnih regulatornih potreba, može se razmotriti mogućnost primjene dodatne, više fiksne doze od 5 000 mg/kg. Prepoznajući potrebu da se zaštiti dobrobit životinja, ispitivanje uz primjenu doze od 5 000 mg/kg ne preporuča se i može doći u obzir samo u slučajevima kad postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti od neposrednog značaja za zaštitu ljudskog zdravlja ili zdravlja životinja (9).

Inicijalna studija

Pravila prema kojima se primjenjuje sekvencijski postupak prikazan u Dodatku 1. proširuju se kako bi obuhvatila i dozu od 5 000 mg/kg. Prema tome, kad se u inicijalnoj studiji primjenjuje početna doza od 5 000 mg/kg, ishod A (smrt) nalaže ispitivanje još jedne životinje na dozu od 2 000 mg/kg; u slučaju ishoda B i C (očita toksičnost ili nema toksičnosti) dozvoljeno je kao početnu dozu u glavnoj studiji primijeniti dozu od 5 000 mg/kg. Isto tako, ako se primjenjuje početna doza različita od 5 000 mg/kg, u slučaju ishoda B ili C pri dozi od 2 000 mg/kg ispitivanje se nastavlja do 5 000 mg/kg; ishod A kod kasnije primijene doze od 5 000 mg/kg nalaže da početna doza u glavnoj studiji bude 2 000 mg/kg, ishod B ili C nalaže početnu dozu od 5 000 mg/kg u glavnoj studiji.

▼B

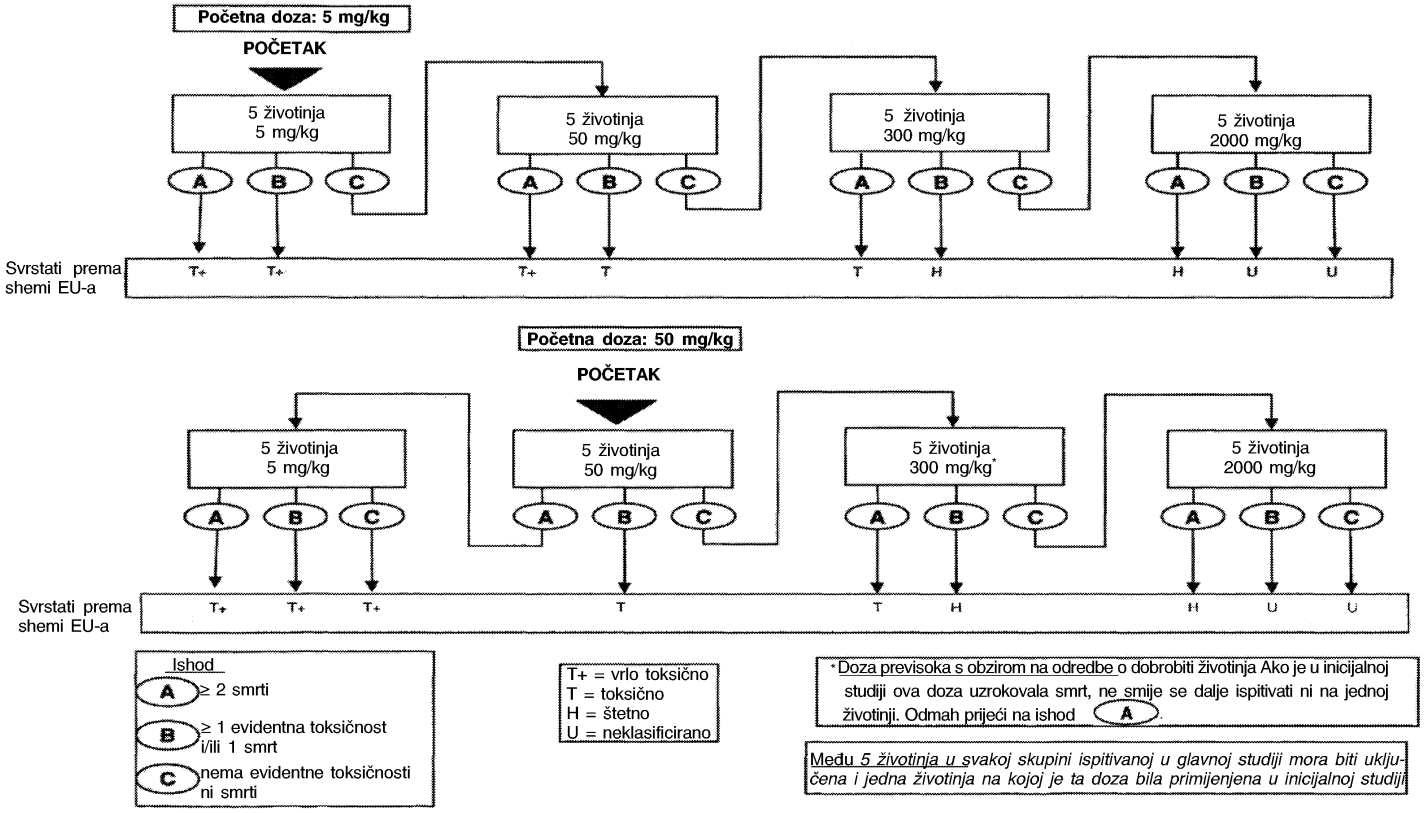
Glavna studija

Pravila prema kojima se primjenjuje sekvencijski postupak iz Dodatka 2., proširuju se kako bi obuhvatila i dozu od 5 000 mg/kg. Prema tome, kad se u glavnom pokusu koristi početna doza od 5 000 mg/kg, ishod A (≥ 2 smrti) nalaže ispitivanje još jedne skupine životinja na dozu od 2 000 mg/kg; u slučaju ishoda B (evidentna toksičnost i/ili ≤ 1 smrt) ili C (nema toksičnosti) tvar se ne klasificira prema GHS-u. Isto tako, ako se primjenjuje početna doza različita od 5 000 mg/kg, u slučaju ishoda C pri dozi od 2 000 mg/kg ispitivanje se nastavlja do 5 000 mg/kg; u slučaju ishoda A kod primijene doze od 5 000 mg/kg tvar se klasificira u GHS kategoriju 5, a u slučaju ishoda B ili C tvar se ne klasificira prema GHS-u.

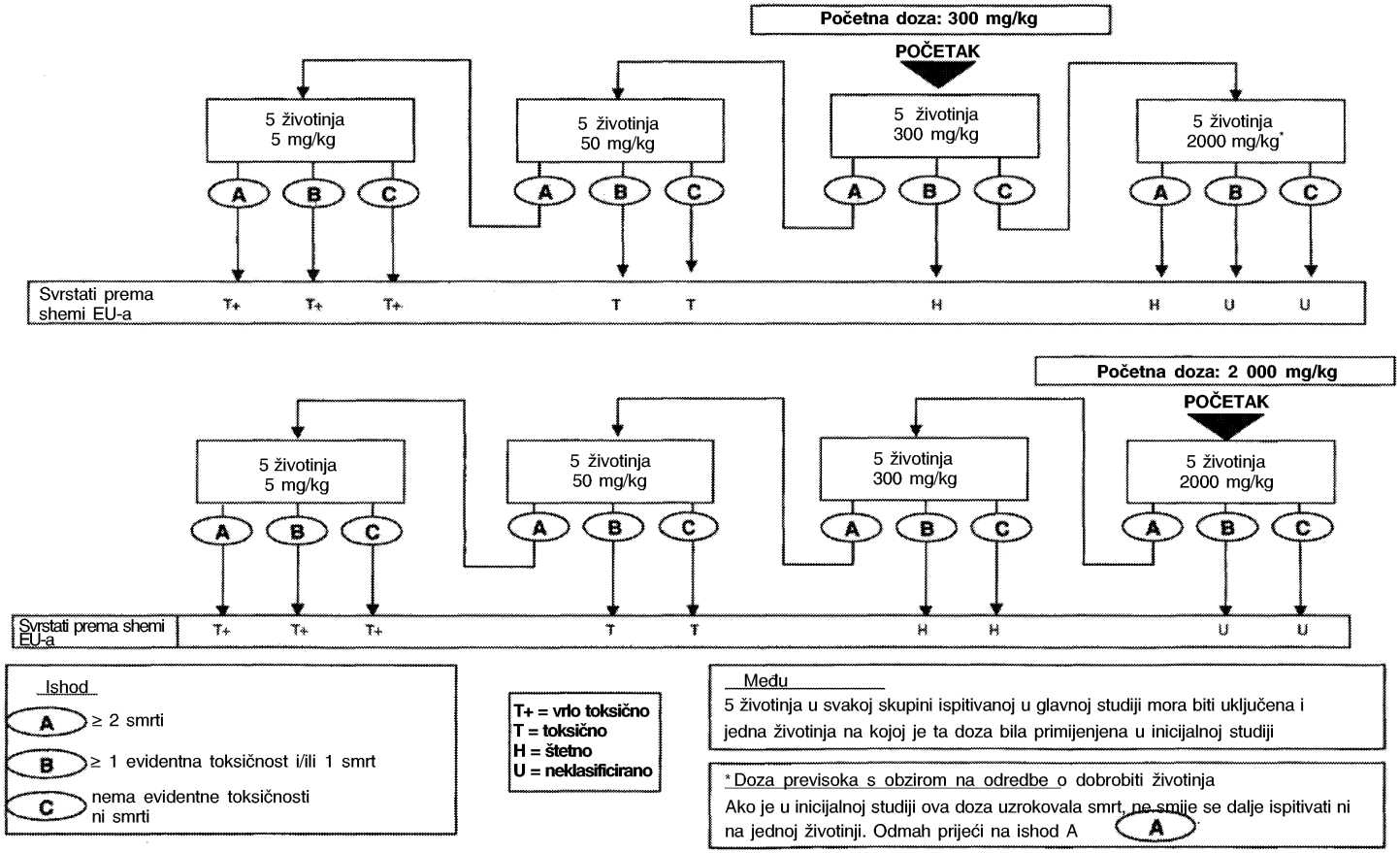
Dodatak 4.

ISPITNA METODA B.1. bis

Smjernice za klasifikaciju prema shemi EU-a koju treba primjenjivati tijekom prijelaznog razdoblja do potpune provedbe Globalno usklađenog klasifikacijskog sustava (GHS) (uzeto iz referentnog dokumenta (8))



▼B


Početna doza: 300 mg/kg
POČETAK
5 životinja 5 mg/kg
5 životinja 50 mg/kg
5 životinja 300 mg/kg
5 životinja 2000 mg/kg*
A B C
Svrstati prema shemi EU-a
T+ T+ T+ T T H H U U
Početna doza: 2 000 mg/kg
POČETAK
5 životinja 5 mg/kg
5 životinja 50 mg/kg
5 životinja 300 mg/kg
5 životinja 2000 mg/kg
A B C
Svrstati prema shemi EU-a
T+ T+ T+ T T H H U U
Ishod
A ≥ 2 smrti
B ≥ 1 evidentna toksičnost i/ili 1 smrt
C nema evidentne toksičnosti ni smrti
T+ = vrlo toksično
T = toksično
H = štetno
U = neklasificirano
Među
5 životinja u svakoj skupini ispitivanoj u glavnoj studiji mora biti uključena i jedna životinja na kojoj je ta doza bila primijenjena u inicijalnoj studiji
* Doza previsoka s obzirom na odredbe o dobrobiti životinja
Ako je u inicijalnoj studiji ova doza uzrokovala smrt, ne smije se dalje ispitivati ni na jednoj životinji. Odmah prijeći na ishod A
A

▼B

B.1 tris. **AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA UTVRĐIVANJA KLASA AKUTNE TOKSIČNOSTI**

1. **METODA**

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 423 (2001.)

1.1. UVOD

Metoda utvrđivanja klasa akutne oralne toksičnosti (1) prikazana u ovom ispitivanju fazni je postupak u kojemu se u svakoj fazi koriste po tri životinje istog spola. Za utvrđivanje toksičnosti ispitivane tvari u prosjeku mogu biti potrebne dvije do četiri faze, što ovisi o tome kad će kod životinje nastupiti smrt i/ili stanje umiranja. Ovaj je postupak ponovljiv, za njega se koristi vrlo mali broj životinja i omogućuje rangiranje tvari na sličan način kao i ostale metode ispitivanja akutne toksičnosti. Metoda utvrđivanja klasa akutne toksičnosti temelji se na biometrijskim procjenama (2)(3)(4)(5) s fiksnim dozama, koje su na primjeren način odvojene kako bi se omogućilo rangiranje tvari u svrhu klasifikacije i procjene opasnosti. Nakon usvajanja 1996. provedena je obimna validacija ove metode *in vivo* uz korištenje usporednih podataka o LD_{50} dobivenih iz literature, kako na nacionalnoj (6) tako i na međunarodnoj razini (7).

Upute za odabir najprimjerenije ispitne metode za određenu svrhu mogu se pronaći u Smjernicama za ispitivanje akutne oralne toksičnosti (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing) (8). Taj dokument sadrži i dodatne informacije o provođenju i tumačenju rezultata ispitne metode B.1tris.

Ispitivane tvari ne treba primjenjivati u dozama za koje je poznato da uzrokuju znatnu bol i stres zbog nagrizajućeg i izrazito nadražujućeg djelovanja. Životinje koje su na umoru, odnosno životinje koje očito trpe jake bolove ili pokazuju znakove jakog i dugotrajnog stresa treba humano usmrtiti, a pri tumačenju rezultata ispitivanja tretirati jednako kao i životinje koje su uginule tijekom ispitivanja. Kriteriji za donošenje odluke o usmrćivanju životinja koje su na umoru ili jako trpe i upute o prepoznavanju predvidive ili neminovne smrti, predmet su zasebnog dokumenta sa smjernicama (9).

U metodi se koriste unaprijed određene doze, a rezultati omogućuju da se tvar rangira i klasificira prema Globalnom usklađenom sustavu za razvrstavanje kemikalija koje uzrokuju akutnu toksičnost (10).

U načelu ova metoda nije predviđena za točno izračunavanje LD_{50}, ali ona omogućuje utvrđivanje definiranog raspona izloženosti kod kojega se očekuje smrtnost, budući da smrt određenog broja životinja još uvijek predstavlja glavnu završnu točku ovog ispitivanja. Metoda dozvoljava utvrđivanje vrijednosti LD_{50} samo u slučajevima kad najmanje dvije doze rezultiraju smrtnošću višom od 0 % i nižom od 100 %. Upotreba odabranih unaprijed utvrđenih doza, neovisno o ispitnoj tvari, uz klasifikaciju koja je izričito povezana s brojem životinja opažanih u različitim stanjima pruža laboratorijima bolje mogućnosti u pogledu ponovljivosti i dosljednosti pri izvještavanju.

▼B

Prije početka studije ispitni laboratorij mora razmotriti sve informacije o ispitivanoj tvari. Te informacije uključuju identitet i kemijsku strukturu tvari, njezina fizikalno-kemijska svojstva, rezultate bilo kojih drugih *in vivo* ili *in vitro* ispitivanja toksičnosti te tvari, toksikološke podatke o strukturno srodnim tvarima, kao i predviđenu primjenu tvari. Te su informacije neophodne kako bi se sve zainteresirane strane uvjerile da je predmetno ispitivanje relevantno za zaštitu ljudskog zdravlja i da će pomoći pri odabiru najprikladnije početne doze.

1.2. DEFINICIJE

Akutna oralna toksičnost: odnosi se na štetne učinke koji se javljaju nakon primjene prve doze ispitivane tvari ili nakon nekoliko doza danih unutar 24 sata.

Odgođena smrt: znači da životinja ne ugine niti se čini da je na umoru unutar 48 sati, već ugine kasnije tijekom 14-dnevnog razdoblja opažanja.

Doza: količina ispitivane tvari koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane tvari po jedinici mase pokusne životinje (mg/kg).

GHS: Globalno usklađeni sustav klasifikacije kemijskih tvari i mješavina. Zajednički projekt OECD-a (ljudsko zdravlje i okoliš), UN-ovog Odbora stručnjaka za prijevoz opasnih tereta (fizikalno-kemijska svojstva), te ILO-a (obavještavanje o opasnostima), koordiniran Međuorganizacijskim programom za pravilno rukovanje kemikalijama (IOMC).

Neminovna smrt: kad se stanje umiranja ili smrt životinje očekuje prije idućeg planiranog vremena opažanja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodavaca uključuju grčeve, bočni položaj, ležanje i drhtavicu. (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (9)).

LD_{50} (srednja smrtonosna doza): statistički određena jednokratna doza tvari za koju se očekuje da će kod 50 posto životinja izazvati smrt ako se primjeni oralnim putem. Vrijednost LD_{50} izražava se kao masa ispitivane tvari po jedinici mase pokusne životinje (mg/kg).

Granična doza: odnosi se na gornju graničnu dozu koja se primjenjuje u ispitivanju (2 000 ili 5 000 mg/kg).

Stanje umiranja: kad je životinja na umoru, odnosno kad ne može preživjeti čak ni ako se tretira (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (9)).

Predvidiva smrt: prisutnost kliničkih znakova koji ukazuju na smrt koja će nastupiti u znanom budućem vremenu prije planiranog kraja pokusa, na primjer: nemogućnost životinje da dosegne vodu ili hranu. (Za više pojedinosti vidjeti Smjernice za humano usmrćivanje (9)).

▼B

1.3. NAČELO ISPITIVANJA

Načelo ovog ispitivanja je da se na temelju faznog postupka uz upotrebu minimalnog broja životinja u svakoj fazi dobije dovoljna količina informacija o akutnoj toksičnosti ispitivane tvari koja će omogućiti klasifikaciju te tvari. Tvar se oralno daje skupini pokusnih životinja u jednoj od utvrđenih doza. Tvar se ispituje uz primjenu faznog postupka kod kojega se u svakoj fazi koriste po tri životinje istog spola (obično ženke). Izostanak ili prisutnost smrtnosti životinja na koje je doza bila primijenjena u jednoj fazi odredit će sljedeću fazu, npr.:

— daljnje ispitivanje nije potrebno,

— primjena jednake doze na sljedeće tri životinje,

— primjena sljedeće više ili sljedeće niže doze na sljedeće tri životinje.

Pojedinosti o ispitnom postupku navedene su u Dodatku 1. Ova metoda omogućuje procjenu u svrhu klasifikacije ispitivane tvari u jednu od klasa toksičnosti utvrđenih na temelju fiksne granične vrijednosti LD_{50}.

1.4. OPIS METODE

1.4.1. **Odabir životinjske vrste**

Najprimjerenija vrsta glodavaca je štakor, iako se mogu koristiti i neke druge vrste glodavaca. Uobičajeno je koristiti ženke (9). Razlog je tome što je pretraživanjem literature o uobičajenim testovima u kojima se primjenjuje LD_{50} utvrđeno da razlike u osjetljivosti spolova gotovo da i nema, ali u slučajevima gdje su razlike opažene, ženke općenito pokazuju nešto veću osjetljivost (11). Međutim, ako saznanja o toksikološkim ili toksikokinetičkim svojstvima strukturno srodnih kemikalija ukazuju na to da bi osjetljiviji mogli biti mužjaci, treba koristiti mužjake. Ako se ispitivanja provode na mužjacima, treba navesti razloge za njihovo korištenje.

U ispitivanjima treba koristiti zdrave mlade odrasle primjerke životinja koje pripadaju najčešće korištenim sojevima laboratorijskih životinja. Treba koristiti ženke koje nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na početku primjene doza svaka životinja treba biti između 8 i 12 tjedana starosti, a njezina masa treba biti u okviru ± 20 % srednje mase svih prethodno testiranih životinja.

1.4.2. **Uvjeti držanja i hranjenja životinja**

Temperatura prostorije za držanje pokusnih životinja treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako relativna vlažnost zraka treba biti barem 30 % i po mogućnosti ne prelaziti 70 %, osim za vrijeme čišćenja prostorije, treba je nastojati održavati na 50-60 %. Osvjetljenje treba biti umjetno i mora se u slijedu izmjenjivati 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Što se tiče hranjenja, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine pitke vode. Životinje se mogu u kavezima držati skupno, razvrstane prema primijenjenim dozama, ali broj životinja koji se drži u jednom kavezu ne smije ometati nesmetano opažanje svake životinje.

▼B

1.4.3. **Priprema životinja**

Životinje se nasumce odabiru, označavaju, kako bi se mogle pojedinačno razlikovati, i drže u kavezima barem 5 dana prije početka primjene doza da bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

1.4.4. **Priprema doza**

Općenito, ispitivane tvari treba primjenjivati u rasponu doza jednakog volumena, a mijenjati treba koncentraciju pripravka koji se dozira. Međutim, kada treba testirati neki tekući krajnji proizvod ili mješavinu, za kasniju ocjenu opasnosti ispitivane tvari relevantnija može biti primjena te tvari u nerazrijeđenom obliku, tj. pri stalnoj koncentraciji, a neka regulatorna tijela takvu primjenu postavljaju kao zahtjev. U svakom slučaju, kod primjene se ne smije prekoračiti maksimalni volumen doze. Maksimalni volumen tekućine koji se smije odjednom primijeniti ovisi o veličini pokusne životinje. Kod glodavaca, taj volumen obično ne smije biti veći od 1 ml/100 g mase životinje: međutim, u slučaju primjene vodenih otopina može doći u obzir i doza od 2 ml/100 g mase životinje. Što se tiče formulacije pripravka koji se dozira, gdje god je moguće preporuča se upotreba vodene otopine/suspenzije/emulzije, a tek onda, po prioritetnom redoslijedu, uljne otopine/suspenzije/emulzije (npr. kukuruzno ulje) ili otopine za koje se koriste drugi nosači. Za sve nosače, osim vode, moraju biti poznata njihova toksikološka svojstva. Doze se moraju pripremati neposredno prije primjene, osim ako se radi o pripravku za koji se zna da će tijekom upotrebe zadržati prihvatljivu stabilnost.

1.5. POSTUPAK

1.5.1. **Primjena doza**

Ispitivana se tvar primjenjuje u jednoj dozi oralnom intubacijom pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. U izvanrednim okolnostima, kad jednokratna primjena doze nije moguća, jedna se doza može dati i razdijeljena u nekoliko manjih dijelova tijekom vremenskog razdoblja ne dužeg od 24 sata.

Prije primjene doza životinje trebaju postiti (npr. u slučaju štakora, hranu, ali ne i vodu treba uskratiti preko noći; kod miševa, hranu, ali ne i vodu treba uskratiti na 3-4 sata). Nakon posta životinje treba izvagati te primijeniti ispitivanu tvar. Nakon što se tvar primijeni, hrana se može uskratiti sljedeća 3-4 sata kod štakora ili 1-2 sata kod miševa. U slučajevima kad se doza primjenjuje u nekoliko manjih dijelova kroz određeno vremensko razdoblje, ovisno o dužini tog razdoblja možda će biti potrebno životinjama dati hranu i vodu.

1.5.2. **Broj životinja i visina doza**

U svakoj se fazi koriste po tri životinje. Doza koja će se koristiti kao početna doza odabire se između četiri fiksne doze od 5, 50, 300 i 2 000 mg/kg tjelesne mase. Početna doza treba biti ona za koju je najvjerojatnije da će prouzročiti smrtnost nekih od životinja na koje se primijeni. Dijagrami toka iz Dodatka 1. opisuju postupak koji treba provesti za svaku od početnih doza. Osim toga, u Dodatku 4. dane su smjernice za klasifikaciju u sustavu EU-a, dok se ne počne primjenjivati novi GHS.

▼B

Kad se iz raspoloživih informacija može zaključiti da smrtnost pri najvišoj početnoj dozi (2 000 mg/kg tjelesne mase) nije vjerojatna, treba obaviti granični test. Ako o tvari koju treba ispitati nema nikakvih informacija, radi dobrobiti životinja preporuča se primjena početne doze od 300 mg/kg tjelesne mase.

Vremenski interval između tretiranja dviju skupina ovisi o nastupu, trajanju i jačini znakova toksičnosti. Tretiranje životinja sljedećom dozom treba odgoditi dok nije sigurno preživljavanje životinja koje su primile prethodnu dozu.

Iznimno, i samo u slučajevima kad je to opravdavano posebnim regulatornim potrebama, može se razmotriti primjena dodatne, više fiksne doze od 5 000 mg/kg (vidjeti Dodatak 2). Zbog brige o dobrobiti životinja, ispitivanje na životinjama u okviru GHS kategorije 5 (2 000-5 000 mg/kg) ne preporuča se i može doći u obzir samo u slučajevima kad postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti od neposrednog značaja za zaštitu ljudskog zdravlja, zdravlja životinja, ili za zaštitu okoliša.

1.5.3. **Granični test**

Granični se test prvenstveno koristi u situacijama kad izvoditelj ispitivanja ima informacije koje kazuju da ispitivani materijal vjerojatno nije toksičan, tj. da postaje toksičan samo iznad regulatornih graničnih doza. Informacije o toksičnosti ispitivanog materijala mogu se temeljiti na saznanjima o sličnim ispitivanim spojevima ili sličnim ispitivanim mješavinama ili proizvodima, uzimajući u obzir identitet i postotak komponenata za koje se zna da su toksikološki značajne. U situacijama kad podataka o toksičnosti ima malo ili ih uopće nema, ili kada se očekuje da će ispitivani materijal biti toksičan, treba obaviti glavni test.

Granični test uz primjenu jedne doze od 2 000 mg/kg tjelesne mase može se obaviti na šest životinja (po tri životinje u svakoj fazi). Iznimno se može obaviti granični test uz primjenu jedne doze od 5 000 mg/kg na tri životinje (vidjeti Dodatak 2.). Ako ispitivana tvar uzrokuje smrt životinje, možda će biti potrebno daljnje ispitivanje sa sljedećom nižom dozom.

1.6. OPAŽANJA

Nakon primjene doze životinje se opažaju pojedinačno, barem jedanput tijekom prvih 30 minuta, periodično tijekom prva 24 sata, uz posebnu pozornost tijekom prva 4 sata, a zatim jednom dnevno u trajanju od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno izlučiti iz studije i humano usmrtiti zbog njezine dobrobiti ili ako se utvrdi smrt životinje. Međutim, trajanje opažanja ne bi smjelo biti strogo određeno. Treba ga utvrditi na temelju toksičkih reakcija, početka i trajanja oporavka i prema potrebi ga se može produžiti. Važno je vrijeme pojave i nestajanja prvih znakova toksičnosti, posebno ako postoji tendencija da se znakovi toksičnosti pojave kasnije (12). Svi se rezultati opažanja sustavno bilježe, pri čemu se o svakoj životinji vode posebni zapisi.

▼B

Dodatna opažanja bit će potrebna ako životinje nastave pokazivati znakove toksičnosti. Treba opažati promjene na koži i dlaci, očima i sluznicama, na dišnom i cirkulacijskom sustavu, te na autonomnom i centralnom živčanom sustavu, kao i promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i ponašanju. S posebnom pozornošću treba opažati drhtavicu, grčeve, slinjenje, proljev, otupjelost, san i komu. Treba poštovati načela i kriterije navedene u Smjernicama za humano usmrćivanje (9). Životinje za koje se utvrdi da su u stanju umiranja i životinje koje pokazuju da trpe jake bolove ili dugotrajni stres treba humano usmrtiti. U slučajevima kad se životinje usmrćuje iz humanih razloga ili se utvrdi njihova smrt, vrijeme smrti treba zabilježiti što točnije.

1.6.1. **Tjelesna masa**

Pojedinačnu masu životinja treba utvrditi neposredno prije primjene ispitivane tvari, a nakon toga najmanje jednom tjedno. Promjene u masi treba izračunati i zabilježiti. Na kraju ispitivanja preživjele se životinje izvažu i potom humano usmrte.

1.6.2. **Patologija**

Sve pokusne životinje (uključujući i one koje uginu za vrijeme ispitivanja ili ih se izluči iz studije zbog njihove dobrobiti) treba podvrgnuti obdukciji. Za svaku životinju posebno treba zabilježiti sve veće patološke promjene. Treba razmotriti i mogućnost obavljanja mikroskopskog pregleda organa životinja koje su nakon primjene prve doze preživjele 24 ili više sati i na kojima su obdukcijom utvrđene velike patološke promjene, budući da se na taj način mogu prikupiti korisne informacije.

2. **PODACI**

Treba prikupiti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba rezimirati u obliku tablice u kojoj će za svaku ispitnu skupinu biti naveden broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje su pokazale znakove toksičnosti, broj životinja kod kojih je tijekom ispitivanja utvrđena smrt ili su bile usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti svake pojedinačne životinje, te opis i vremenski tijek toksičkih učinaka i reverzibilnosti, kao i nalazi obdukcije.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. **Izvješće o ispitivanju**

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije, prema potrebi:

ispitivana tvar:

— fizikalni oblik, čistoća i, tamo gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući izomerizaciju),

— identifikacijski podaci, uključujući CAS broj.

Nosač (prema potrebi):

— obrazloženje za odabir nosača, ako se ne radi o vodi.

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta/soj,

▼B

— mikrobiološki status životinje, ako je poznat,

— broj, starost i spol životinja (uključujući, prema potrebi, razloge za korištenje mužjaka umjesto ženki),

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.

Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari, uključujući pojedinosti o fizikalnom obliku materijala koji se primjenjivao,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari koji uključuju volumene doza i vrijeme doziranja,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući pojedinosti o vrsti i izvoru vode),

— obrazloženje za odabir početne doze.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka o reakcijama i visini doza za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti, uključujući smrtnost, te priroda, jačina i trajanje toksičkog učinka),

— tablični prikaz tjelesne mase i promjena u tjelesnoj masi,

— masa pojedinačnih životinja na dan primjene doze, zatim u tjednim intervalima, te u vrijeme smrti ili usmrćivanja,

— datum i vrijeme smrti, ako do nje dođe prije planiranog usmrćivanja,

— vrijeme pojavljivanja znakova toksičnosti i jesu li ti znakovi bili reverzibilni kod svake životinje,

— nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju, ako su dostupni.

Diskusija i tumačenje rezultata.

Zaključci.

4. **REFERENCE:**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D (1986) New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, str. 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D (1989) Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, str. 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E (1994) The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, str. 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1995) The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, str. 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E., (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, str. 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D., (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D., (1994) The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, str. 659-670.

(8) OECD, (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

(9) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, str. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R. L., Cotruvo, J.A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, str. 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Dodatak 1.

POSTUPAK KOJI TREBA SLIJEDITI ZA SVAKU POČETNU DOZU

OPĆE PRIMJEDBE

U ispitnim shemama sadržanim u ovom Dodatku prikazan je postupak koji treba slijediti za svaku početnu dozu.

— Dodatak 1.A: Početna doza je 5 mg/kg t.m. (tjelesne mase)

— Dodatak 1.B: Početna doza je 50 mg/kg t.m.

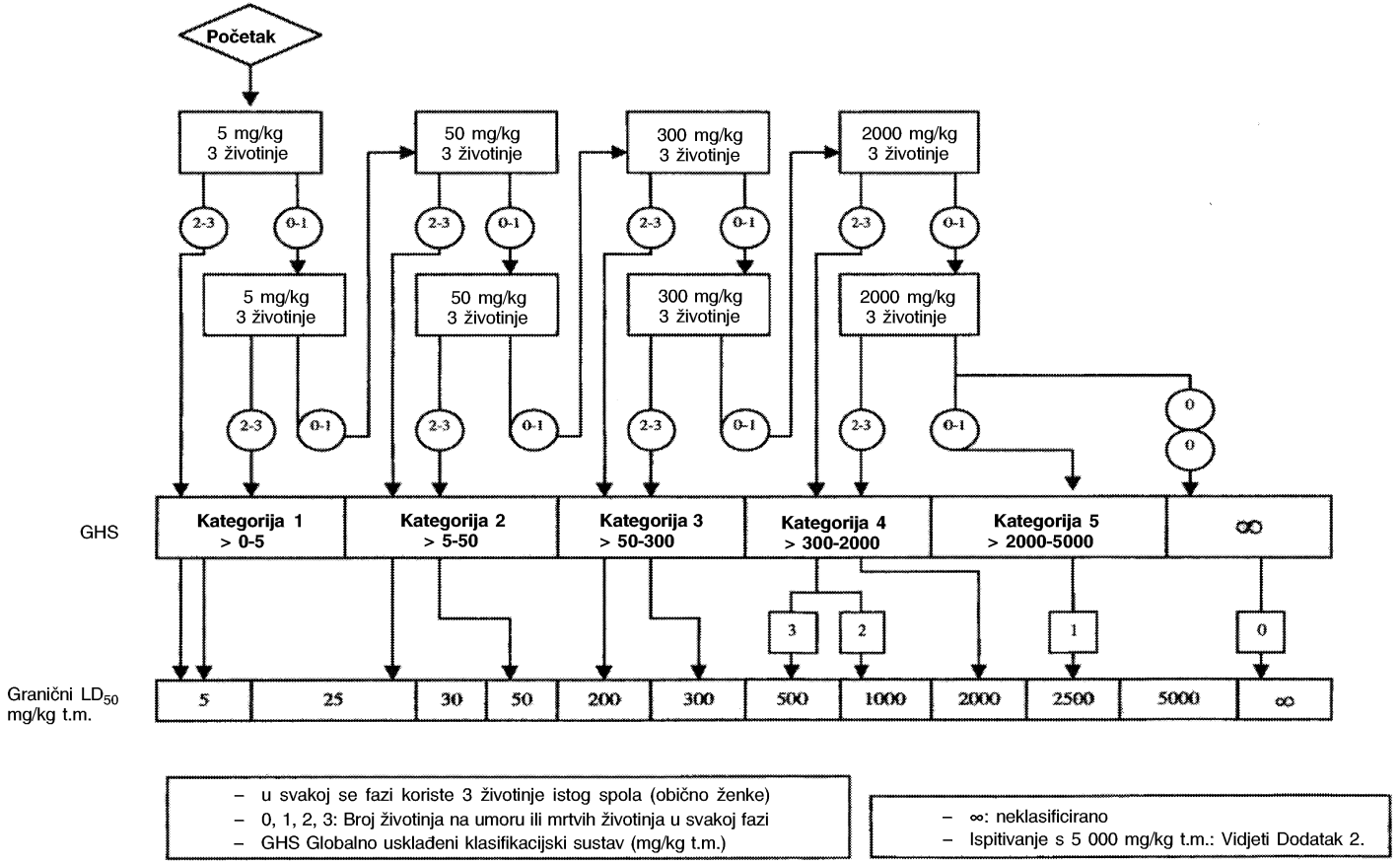
— Dodatak 1.C: Početna doza je 300 mg/kg t.m.

— Dodatak 1.D: Početna doza je 2 000 mg/kg t.m.

Ovisno o broju humano usmrćenih životinja, slijed postupka označavaju strelice.

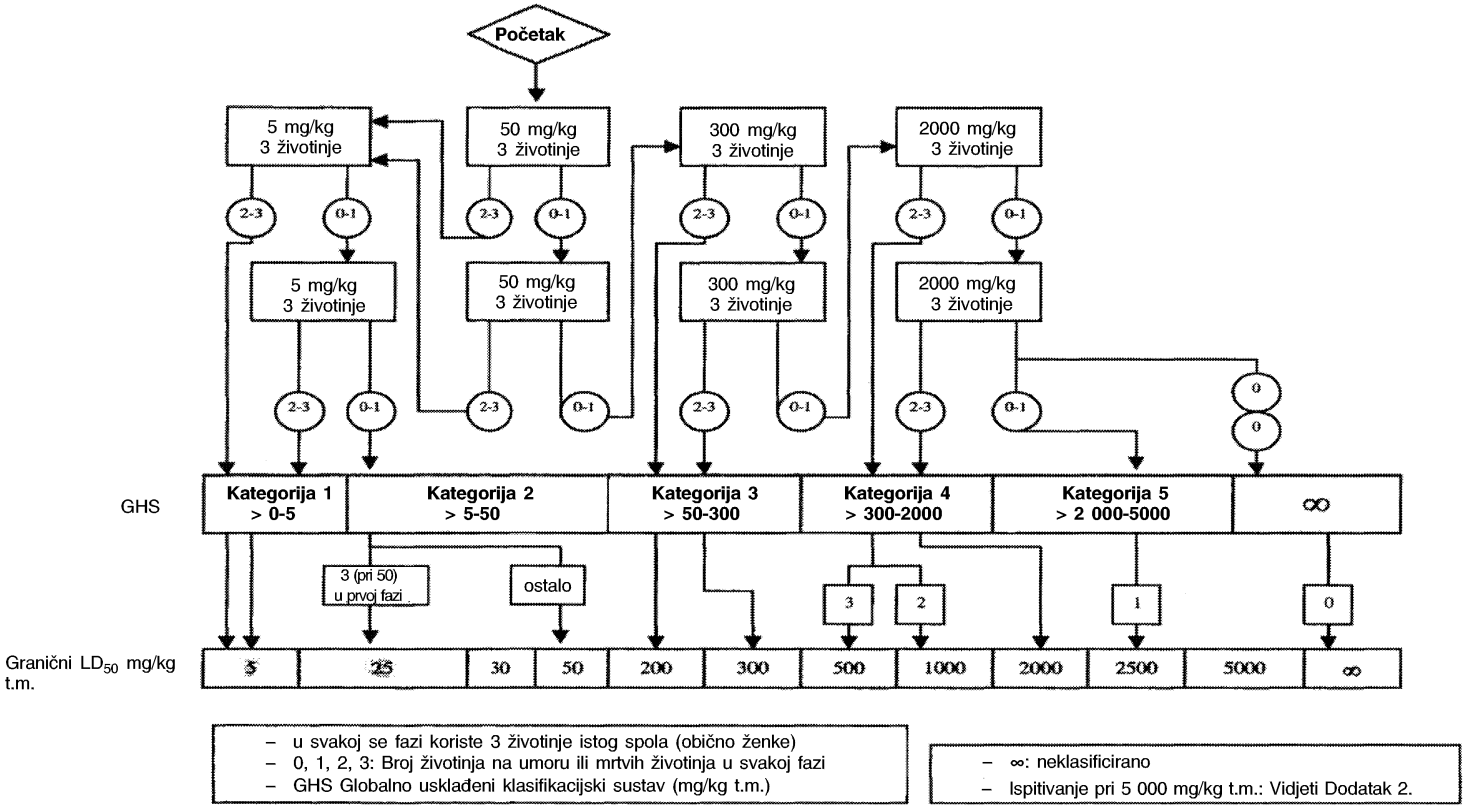
Dodatak 1.A

ISPITNI POSTUPAK S POČETNOM DOZOM OD 5 MG/KG TJELESNE MASE



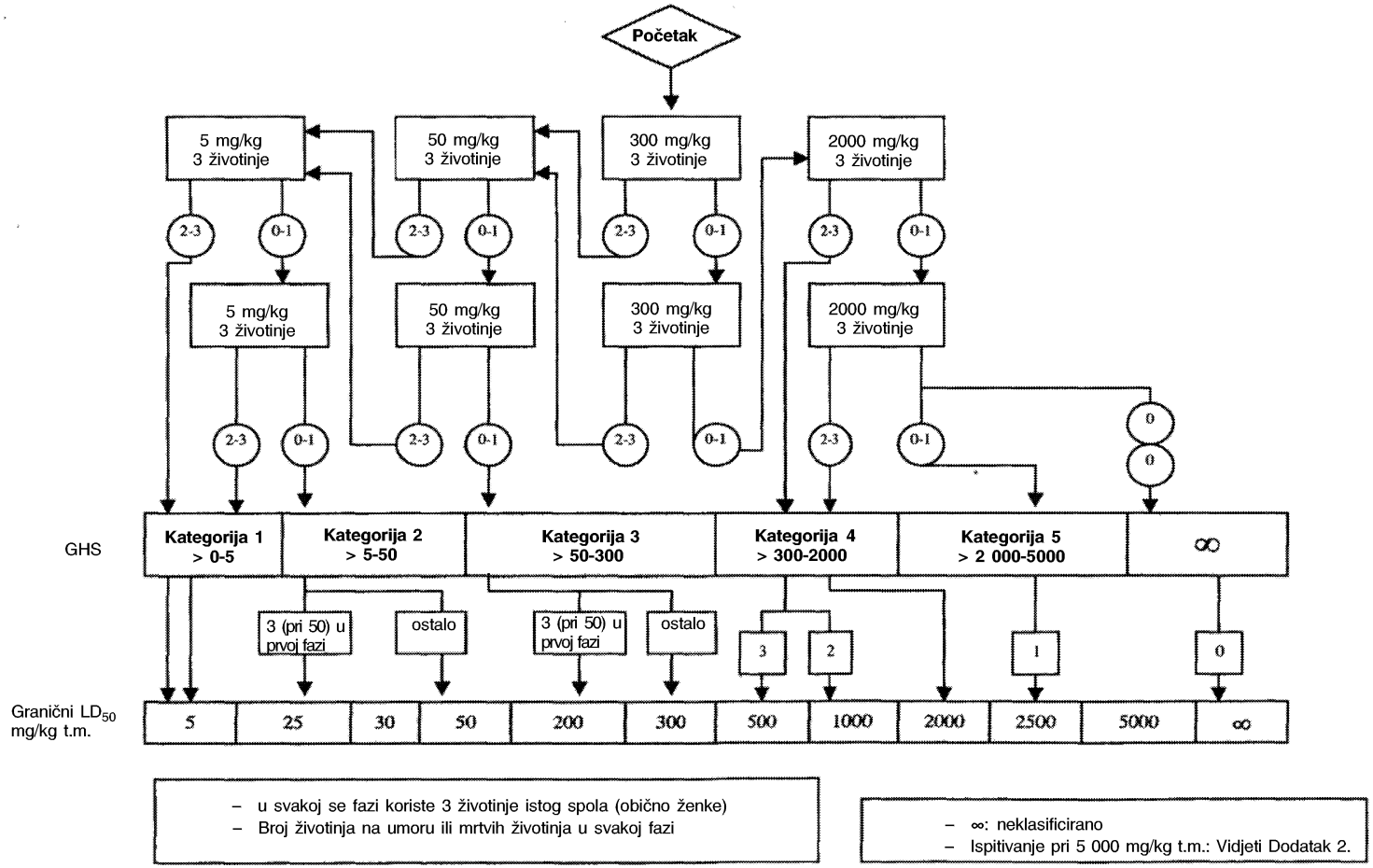
Dodatak 1.B

ISPITNI POSTUPAK S POČETNOM DOZOM OD 50 MG/KG TJELESNE MASE



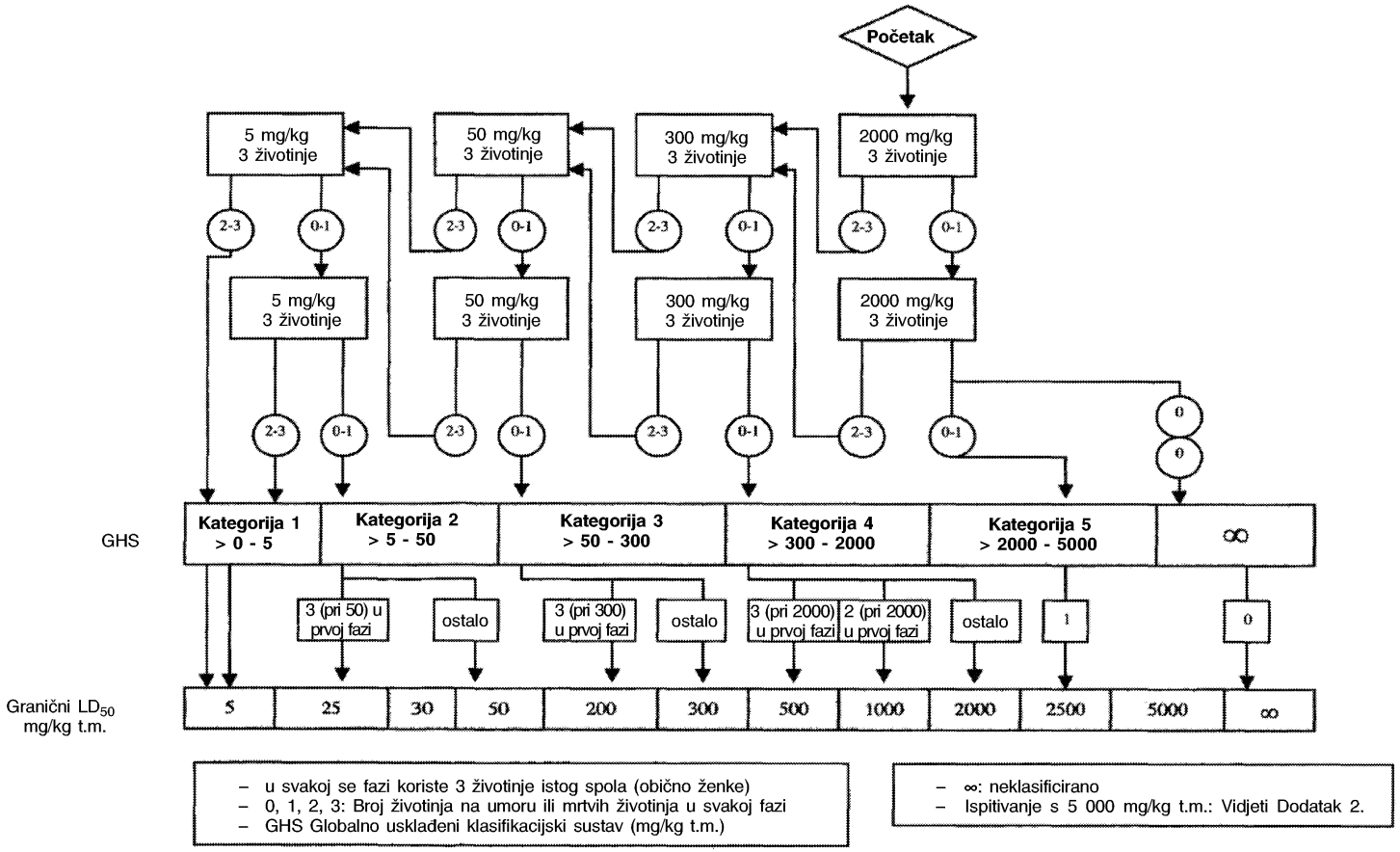
Dodatak 1.C

ISPITNI POSTUPAK S POČETNOM DOZOM OD 300 MG/KG TJELESNE MASE



Dodatak 1.D

ISPITNI POSTUPAK S POČETNOM DOZOM OD 2 000 MG/KG TJELESNE MASE



▼B

Dodatak 2.

KRITERIJI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH TVARI ČIJA JE OČEKIVANA VRIJEDNOST LD_{50} VIŠA OD 2 000 MG/KG, BEZ POTREBE ZA ISPITIVANJEM

Kriteriji za kategoriju opasnosti 5 omogućuju identifikaciju ispitivanih tvari relativno niske akutne toksičnosti, koje u određenim uvjetima mogu predstavljati opasnost za osjetljive populacije. Pretpostavlja se da ove tvari imaju LD_{50} oralno ili dermalno u rasponu od 2 000-5 000 mg/kg ili ekvivalentne doze za druge puteve primjene. Ispitivane tvari mogu se svrstati u kategoriju opasnosti koju definira: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategorija 5 u GHS-u) u sljedećim slučajevima:

(a) ako na ovu kategoriju upućuje bilo koja od ispitnih shema iz Dodatka 2., na temelju incidencije smrtnosti;

(b) ako već postoje pouzdani dokazi koji pokazuju da je LD_{50} u okvirima vrijednosti koje odgovaraju kategoriji 5; ili ako druge toksikološke studije provedene na životinjama ili toksičko djelovanje na ljude izazivaju zabrinutost za ljudsko zdravlje;

(c) ako ekstrapolacija, procjena ili prosudba podataka ne opravdavaju svrstavanje u višu klasu opasnosti; i

— ako postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajno toksičko djelovanje na ljude, ili

— ako se pri ispitivanju do razine vrijednosti kategorije 4, uz oralnu primjenu, zabilježi smrtnost, ili

— ako se stručnom procjenom pri ispitivanju do razine vrijednosti za kategoriju 4 potvrde značajni klinički znakovi toksičnosti koji ne uključuju proljev, piloerekciju (naježenost dlake) ili neuredan izgled, ili

— ako se stručnom procjenom, koja se temelji na drugim studijama na životinjama, potvrde pouzdane informacije koje ukazuju na mogućnost značajnog akutnog djelovanja.

ISPITIVANJE UZ PRIMJENU DOZA IZNAD 2 000 MG/KG

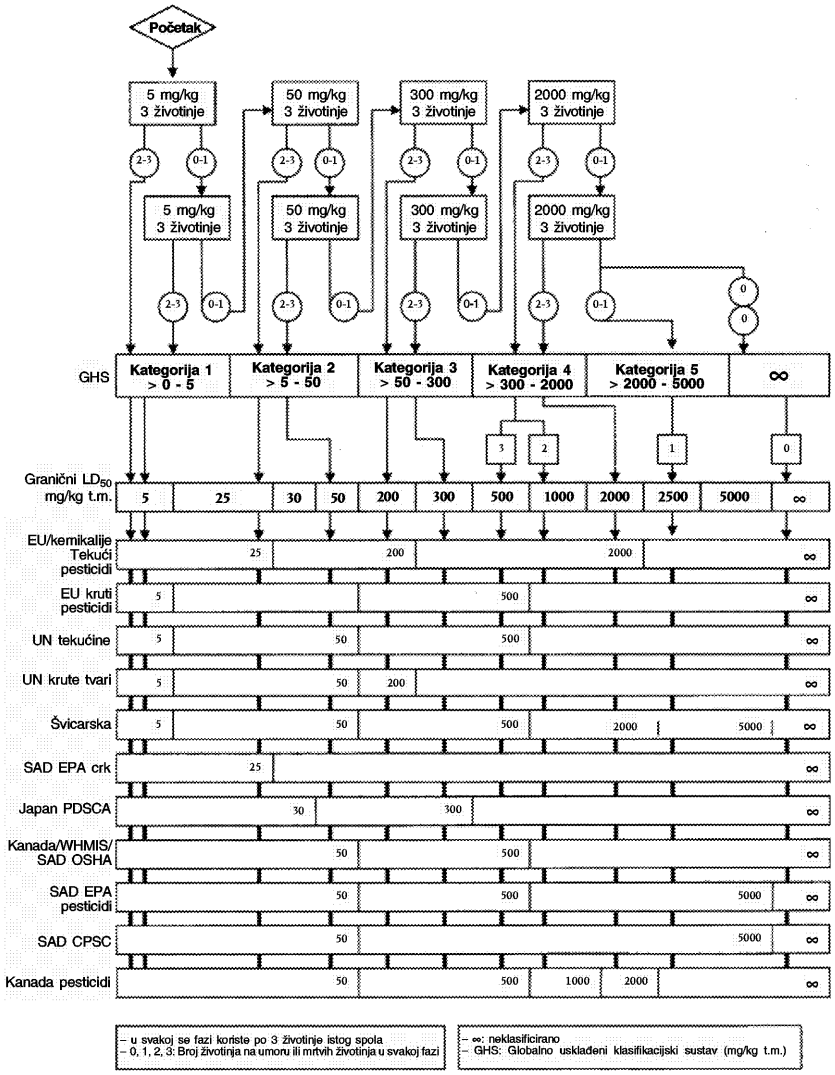
Prepoznajući potrebu da se zaštiti dobrobit životinja, ispitivanje na životinjama u okviru vrijednosti kategorije 5 (5 000 mg/kg) ne preporuča se i može doći u obzir samo u slučajevima kad postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti od neposrednog značaja za zaštitu ljudskog zdravlja ili zdravlja životinja (10). Nikakva druga ispitivanja s višim dozama ne smiju se izvoditi.

Ako je potrebno ispitivanje doze od 5 000 mg/kg, dovoljna je samo jedna faza (tj. tri životinje). Ako prva životinja na koju se primijeni ta doza ugine, ispitivanje se nastavlja uz primjenu doze od 2 000 mg/kg, u skladu s dijagramima toka iz Dodatka 1. Ako prva životinja preživi, doza se primjenjuje na sljedeće dvije životinje. Ako ugine samo jedna od tri životinje, pretpostavlja se da je vrijednost LD_{50} viša od 5 000 mg/kg. Ako uginu obadvije životinje, ispitivanje se nastavlja uz primjenu doze od 2 000 mg/kg.

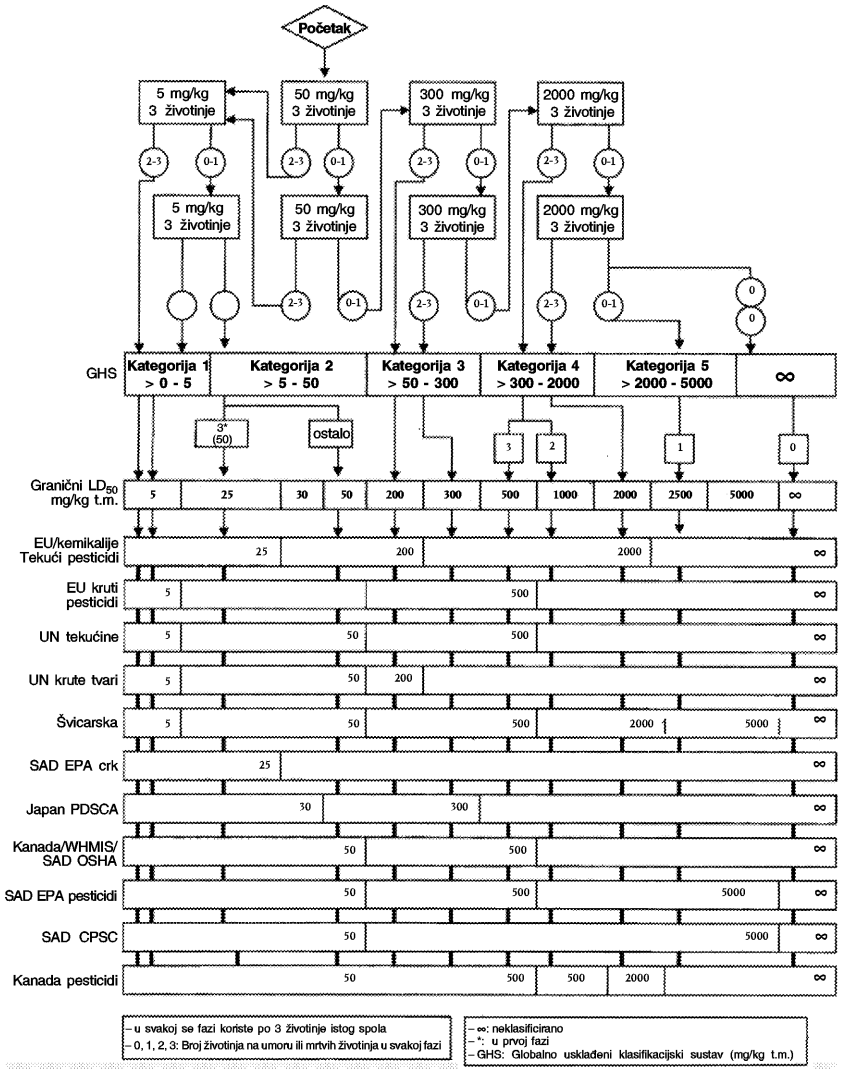
▼B

Dodatak 3.

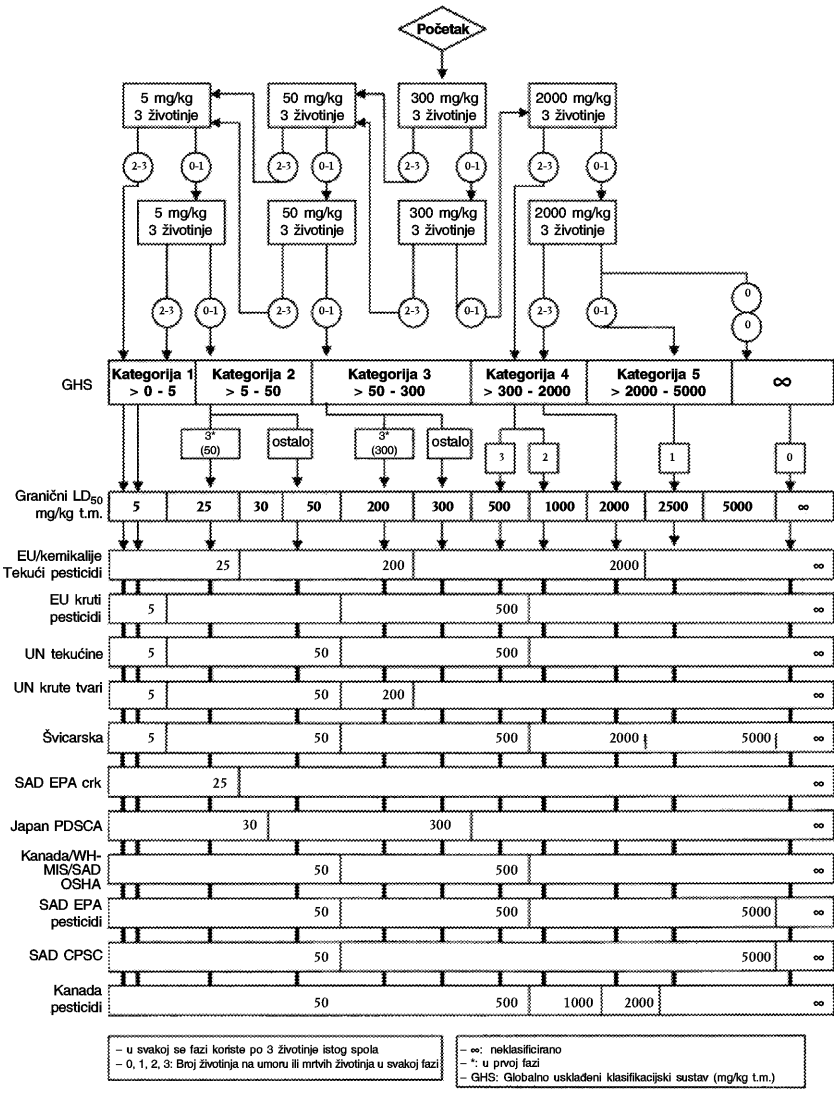
ISPITNA METODA B.1 tris: Smjernice za klasifikaciju prema shemi EU-a koja vrijedi tijekom prijelaznog razdoblja do potpune provedbe Globalno usklađenog klasifikacijskog sustava (GHS) (uzeto iz referentnog dokumenta (8))



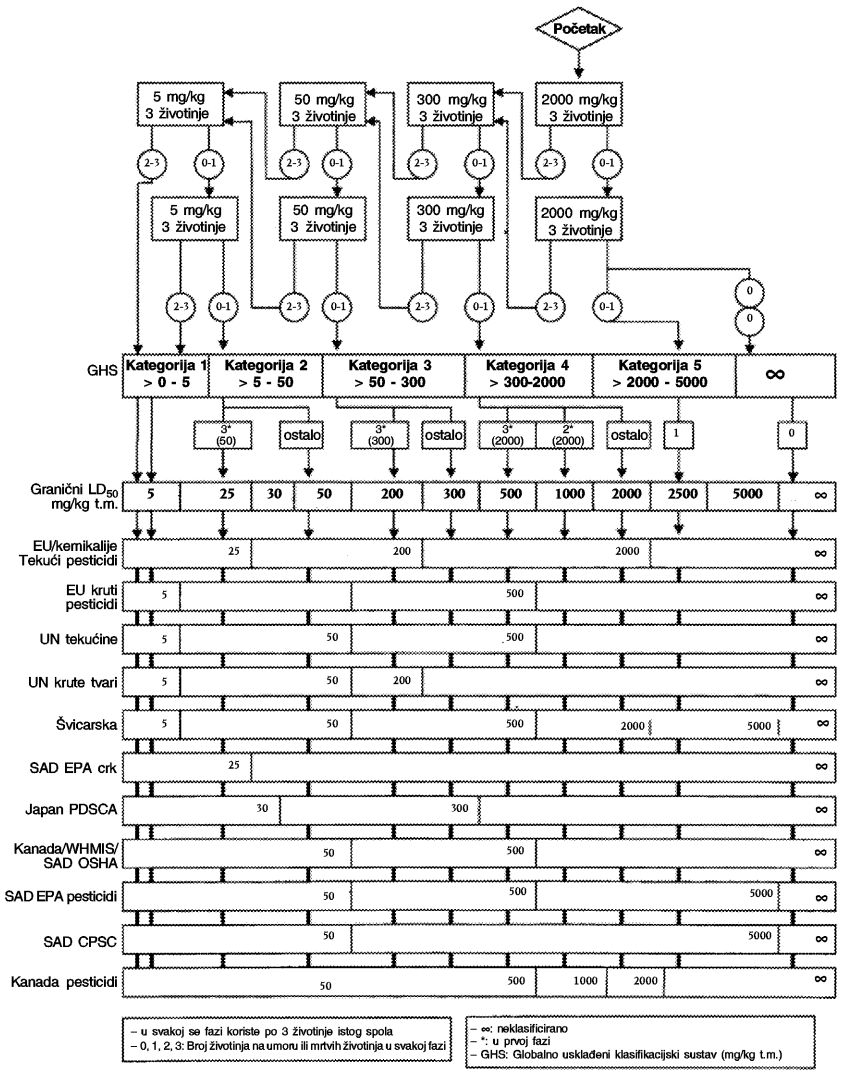
▼B


Početak
5 mg/kg 3 životinje
50 mg/kg 3 životinje
300 mg/kg 3 životinje
2000 mg/kg 3 životinje
5 mg/kg 3 životinje
50 mg/kg 3 životinje
300 mg/kg 3 životinje
2000 mg/kg 3 životinje
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
ostalo
Granični LD50 mg/kg t.m.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalije Tekući pesticidi
EU kruti pesticidi
UN tekućine
UN krute tvari
Švicarska
SAD EPA crk
Japan PDSCA
Kanada/WHMIS/ SAD OSHA
SAD EPA pesticidi
SAD CPSC
Kanada pesticidi
– u svakoj se fazi koriste po 3 životinje istog spola
– 0, 1, 2, 3: Broj životinja na umoru ili mrtvih životinja u svakoj fazi
– ∞: neklasificirano
– *: u prvoj fazi
– GHS: Globalno usklađeni klasifikacijski sustav (mg/kg t.m.)

▼B


Početak
5 mg/kg 3 životinje
50 mg/kg 3 životinje
300 mg/kg 3 životinje
2000 mg/kg 3 životinje
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
ostalo
3* (300)
ostalo
3
2
1
0
Granični LD50 mg/kg t.m.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalije Tekući pesticidi
25 200 2000 ∞
EU kruti pesticidi
5 500 ∞
UN tekućine
5 50 500 ∞
UN krute tvari
5 50 200 ∞
Švicarska
5 50 500 2000 5000 ∞
SAD EPA crk
25 ∞
Japan PDSCA
30 300 ∞
Kanada/WHMIS/SAD OSHA
50 500 ∞
SAD EPA pesticidi
50 500 5000 ∞
SAD CPSC
50 5000 ∞
Kanada pesticidi
50 500 1000 2000 ∞
– u svakoj se fazi koriste po 3 životinje istog spola
– 0, 1, 2, 3: Broj životinja na umoru ili mrtvih životinja u svakoj fazi
– ∞: neklasificirano
– *: u prvoj fazi
– GHS: Globalno usklađeni klasifikacijski sustav (mg/kg t.m.)

▼B


Početak
5 mg/kg 3 životinje
50 mg/kg 3 životinje
300 mg/kg 3 životinje
2000 mg/kg 3 životinje
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300-2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
ostalo
3* (300)
3* (2000)
2* (2000)
1
Granični LD50 mg/kg t.m.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalije Tekući pesticidi
EU kruti pesticidi
UN tekućine
UN krute tvari
Švicarska
SAD EPA crk
Japan PDSCA
Kanada/WHMIS/ SAD OSHA
SAD EPA pesticidi
SAD CPSC
Kanada pesticidi
– u svakoj se fazi koriste po 3 životinje istog spola
– 0, 1, 2, 3: Broj životinja na umoru ili mrtvih životinja u svakoj fazi
– ∞: neklasificirano
– *: u prvoj fazi
– GHS: Globalno usklađeni klasifikacijski sustav (mg/kg t.m.)

▼M4

B.2. AKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a 403 (2009.) (1). Originalna Smjernica za ispitivanje 403 (TG 403) o akutnoj inhalaciji usvojena je 1981. Ova revidirana ispitna metoda B.2 (kao ekvivalent revidiranom TG 403) osmišljena je da bude fleksibilnija, da smanji uporabu životinja te da ispuni regulatorne potrebe. Revidiranu ispitnu metodu karakteriziraju dva tipa ispitivanja: tradicionalni protokol LC_{50} i protokol koncentracija × vrijeme (C × t). Primarne karakteristike ove ispitne metode jesu mogućnost određivanja odnosa koncentracije i reakcije koji mogu imati posljedice od nesmrtonosnih do smrtonosnih kako bi se odredila srednja smrtonosna koncentracija (LC_{50}), prag nesmrtonosne koncentracije (npr. LC01) i nagib te kako bi se utvrdila moguća osjetljivost u odnosu na spol. Protokol C × t treba primijeniti u slučaju specifične regulatorne ili znanstvene potrebe koja zahtijeva testiranje životinja na dulje vrijeme, npr. u svrhu planiranja reakcije u slučaju nužde (npr. određivanje vrijednosti *Acute Exposure Guideline Levels* (AEGL), *Emergency Response Planning Guidelines* (ERPG) ili *Acute Exposure Threshold Levels* (AETL)) ili planiranja iskorištenja površina.

2. Smjernice za provođenje i tumačenje studija ove ispitne metode mogu se pronaći u Smjernici za ispitivanje akutne inhalacijske toksičnosti (GD 39) (2).

3. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog Poglavlja i u GD 39 (2).

4. Ova ispitna metoda omogućuje karakterizaciju ispitivane kemikalije i kvantitativnu procjenu rizika te omogućuje rangiranje i razvrstavanje ispitivanih kemikalija u skladu s Uredbom (EZ) br. 1272/2008 (3). GD 39 (2) donosi smjernice za odabir prikladne ispitne metode za ispitivanje akutnosti. Kada se traži samo informacija o razvrstavanju i označavanju, općenito se preporučuje poglavlje B.52 ovog Priloga (4) [vidjeti GD 39 (2)]. Ispitna metoda B.2 nije specifično namijenjena za ispitivanje specijaliziranih materijala, poput slabo topljivih izometrijskih ili vlaknastih materijala ili proizvedenih nanomaterijala.

UVODNA RAZMATRANJA

5. Kako bi se na minimum svela uporaba životinja, prije razmatranja ispitivanja u skladu s ovom ispitnom metodom ispitni laboratorij u obzir treba uzeti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji, uključujući postojeće studije (npr. poglavlje B.52 ovog Priloga (4)) čiji bi podaci opravdali neprovođenje dodatnih ispitivanja. Informacije koje mogu pomoći u odabiru najprikladnijih vrsta, sojeva, spola, načina izlaganja i prikladnih ispitnih koncentracija obuhvaćaju identitet, kemijsku strukturu te fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije; rezultate bilo kakvih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo*; očekivanu uporabu i potencijal za izlaganje ljudi; dostupne podatke (Q)SAR i toksikološke podatke o tvarima srodne strukture [vidjeti GD 39 (2)].

▼M4

6. Ispitivanje korozivnih i/ili nadražujućih ispitivanih kemikalija u koncentracijama za koje se očekuje da će izazvati ozbiljne bolove i/ili patnje treba izbjegavati koliko je god moguće. Potencijal izazivanja korozije/nadraženosti treba ocijeniti stručnom procjenom uz primjenu dokaza iz ljudskog i životinjskog iskustva (npr. iz ispitivanja uz primjenu ponavljanih doza provedenih u koncentracijama koje ne izazivaju koroziju/nadraženost), postojećih podataka *in vitro* (npr. iz poglavlja B.40, (5), B.40 bis (6) ovog Priloga ili OECD TG 425 (7)), vrijednosti pH, informacija o sličnim tvarima ili drugih podataka koji se odnose na to radi određivanja može li se odustati od daljnjeg ispitivanja. Za specifične regulatorne potrebe (npr. u svrhu planiranja za slučaj nužde) ova se ispitna metoda može upotrijebiti za izlaganje životinja tim materijalima jer voditelju istraživanja ili glavnom istraživaču pruža mogućnost kontrole odabira ciljanih koncentracija. Međutim, ciljane koncentracije ne smiju izazvati ozbiljne učinke korozije/nadraženosti nego učinke dovoljne za produljenje krivulje koncentracije i reakcije na razine koje postižu regulatorni i znanstveni cilj ispitivanja. Te koncentracije treba odabrati zasebno u svakom pojedinačnom slučaju i treba pružiti obrazloženje za odabir koncentracije [vidjeti GD 39 (2)].

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ova revidirana ispitna metoda B.2 osmišljena je da postigne dovoljno informacija o akutnoj toksičnosti ispitivane kemikalije kako bi se omogućilo njezino razvrstavanje te kako bi se pružili podaci o smrtonosnom djelovanju (npr. $LC_{50,}$ LC_{01} i nagib) za jedan od oba spola, kao što je potrebno za kvantitativnu procjenu rizika. Ova ispitna metoda nudi dvije metode. Prva je metoda tradicionalni protokol u kojem se skupine životinja izlažu graničnoj koncentraciji (granični test) ili seriji koncentracija u postupku korak po korak u prethodno određenom trajanju od obično 4 sata. Ostala trajanja izlaganja mogu se primijeniti u specifične regulatorne svrhe. Druga je metoda protokol ($C \times t$) u kojem se skupine životinja izlažu jednoj (granična koncentracija) ili nizu višestrukih koncentracija tijekom više vremenskih razdoblja.

8. Životinje koje ugibaju ili pokazuju izrazite znakove stresa i boli treba humano usmrtiti i u tumačenju rezultata ispitivanja tretirati jednako kao i životinje uginule pri ispitivanju. Kriteriji za donošenje odluke o usmrćivanju životinja u stanju ugibanja ili koje teško pate te upute o prepoznavanju predvidive ili prijeteće smrti predmet su Smjernice za humano usmrćivanje br. 19 OECD-a (8).

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

9. Treba upotrijebiti zdrave, mlade odrasle životinje sojeva koji se obično koriste u laboratorijima. Preferirana vrsta je štakor, a u slučaju uporabe drugih vrsta treba dati obrazloženje.

Priprema životinja

10. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na dan izlaganja životinje moraju biti mlade odrasle jedinke između 8 i 12 tjedana starosti, srednje vrijednosti tjelesne mase od ± 20 % za svaki spol bilo koje prethodno izložene životinje iste dobi. Životinje se odabiru nasumice i označavaju radi pojedinačne identifikacije. Životinje se drže u kavezima najmanje 5 dana prije početka ispitivanja kako bi im se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uvjete. Životinje također treba aklimatizirati na ispitnu aparaturu kratko vrijeme prije ispitivanja jer će se tako smanjiti stres izazvan uvođenjem u novu okolinu.

▼M4

Uzgoj životinja

11. Temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi iznositi 22 ± 3 °C. Relativna vlažnost zraka idealno bi se morala održavati u rasponu od 30 do 70 % iako to možda neće biti moguće kad se kao nosač primjenjuje voda. Prije i nakon izlaganja životinje općenito treba smjestiti u kaveze u skupinama po spolu i koncentraciji, ali broj životinja po kavezu ne smije ometati jasna opažanja svake životinje i tako se trebaju na minimum svesti gubici zbog kanibalizma i borbe. Ako izlaže samo nos životinja, može biti potrebno aklimatizirati životinje na cijevi koje ih sputavaju. Cijevi koje sputavaju životinje ne smiju im nametnuti pretjeran fizički, toplinski ili imobilizacijski stres. Sputavanje može utjecati na fiziološke krajnje učinke, poput tjelesne temperature (hipertermija) i/ili respiratornog minutnog volumena. Ako su dostupni generički podaci koji pokazuju da se takve promjene ne događaju u znatnom opsegu, nije potrebna prethodna prilagodba cijevima koje sputavaju. Životinje, koje su cijelim tijelom izložene aerosolu, tijekom izlaganja treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječilo da se ispitivani aerosol filtrira kroz krzno drugih životinja u istom kavezu. Može se upotrijebiti konvencionalna i certificirana laboratorijska prehrana, osim tijekom izlaganja, u kombinaciji s neograničenom zalihom javne pitke vode. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati tame.

Komore za inhalaciju

12. Pri odabiru komore za inhalaciju u obzir valja uzeti narav ispitivane kemikalije i cilj ispitivanja. Prednost se daje izlaganju samo nosom (koje uključuje samo glavu, samo nos ili samo njušku). Izlaganju samo nosom općenito se daje prednost za ispitivanja tekućih ili krutih aerosola te para koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Posebni ciljevi ispitivanja mogu se bolje postići uporabom izlaganja čitavog tijela, ali to treba opravdati u izvješću o ispitivanju. Kako bi se osigurala stabilnost atmosfere u slučaju primjene komore za čitavo tijelo, ukupni volumen pokusnih životinja ne smije premašiti 5 % volumena komore. Načela tehnika izlaganja samo nosom i čitavim tijelom te njihove specifične prednosti i nedostaci opisani su u GD 39 (2).

UVJETI IZLAGANJA

Primjena koncentracija

13. Izlaganje samo nosom kod štakora može trajati do 6 sati. Ako se miševi izlažu samo nosom, izlaganje općenito ne smije biti dulje od 4 sata. Ako su potrebna istraživanja duljeg trajanja, treba dati obrazloženje [vidjeti GD 39 (2)]. Životinje izložene aerosolu u komorama za izlaganje čitavim tijelom treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječilo gutanje ispitivane kemikalije zbog njegovanja životinja u istom kavezu. Tijekom izlaganja treba obustaviti hranjenje. Voda se može davati tijekom cijelog izlaganja čitavim tijelom.

14. Životinje se izlažu ispitivanoj kemikaliji u vidu plina, pare, aerosola ili njihovih smjesa. Fizikalno stanje koje će se ispitivati ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, odabranoj koncentraciji i/ili fizikalnom obliku koji je obično prisutan tijekom manipulacije ispitivanom kemikalijom i njezine uporabe. Higroskopske i kemijski reaktivne ispitivane kemikalije treba ispitivati u uvjetima suhog zraka. Treba paziti kako bi se izbjeglo stvaranje eksplozivnih koncentracija.

▼M4

Distribucija veličine čestica

15. Određivanje veličine čestica treba provesti za sve aerosole i pare koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Kako bi se omogućilo izlaganje svih relevantnih područja respiratornog trakta, preporučuje se aerosol srednjeg aerodinamičkog promjera čestica (MMAD) u rasponu od 1 do 4 μm s geometrijskom standardnom devijacijom (σ_g) u rasponu od 1,5 do 3,0 (2) (9) (10). Iako treba uložiti razuman napor za postizanje tih standarda, ako se isti ne mogu postići, treba dati stručno mišljenje. Primjerice, isparine metala mogu biti manje od tog standarda, a čestice, vlakna i higroskopni materijali pod nabojem (čija se veličina povećava u vlažnom okolišu respiratornog trakta) mogu premašiti taj standard.

Priprema ispitivane kemikalije u nosaču

16. Za stvaranje odgovarajuće koncentracije i veličine čestica ispitivane kemikalije u atmosferi može se upotrijebiti nosač. U pravilu se prednost daje vodi. Materijali u česticama mogu se podvrgnuti mehaničkim procesima kako bi se postigla potrebna distribucija veličine čestica, no treba paziti da se ispitivana kemikalija ne rastavi niti promijeni. U slučajevima u kojima se smatra da mehanički procesi mijenjaju ispitivanu kemikaliju (npr. ekstremne temperature uslijed prekomjernog mljevenja zbog trenja) treba analitički provjeriti sastav ispitivane kemikalije. Treba primijeniti dovoljnu razinu opreza da se ne bi kontaminirala ispitivana kemikalija. Nije nužno ispitivati nedrobive granulirane materijale koji su namjerno oblikovani tako da se ne mogu inhalirati. Treba primijeniti test atricijom kako bi se dokazalo da se tijekom rukovanja granuliranim materijalom ne stvaraju čestice koje se mogu udahnuti. Ako se tijekom testa atricijom stvore tvari koje se mogu udahnuti, treba provesti test inhalacijske toksičnosti.

Kontrolne životinje

17. Nije potrebna paralelna negativna skupina (zrak). U slučaju primjene drugog nosača osim vode pri stvaranju ispitne atmosfere kontrolna skupina nosača treba se primijeniti samo ako nisu dostupni podaci o povijesnoj inhalacijskoj toksičnosti. Ako ispitivanje toksičnosti ispitivane kemikalije formulirane u nosaču ne pokaže nikakvu toksičnost, znači da nosač nije toksičan u ispitnoj koncentraciji te stoga nema potrebe za kontrolnim nosačem.

PRAĆENJE UVJETA IZLAGANJA

Protok zraka u komori

18. Protok zraka u komori treba pažljivo kontrolirati, neprestano pratiti te bilježiti najmanje jedanput svakog sata tijekom svakog izlaganja. Praćenje ispitne koncentracije (ili stabilnosti) u atmosferi sastavno je mjerenje svih dinamičkih parametara i pruža neizravno sredstvo za kontrolu svih relevantnih parametara za stvaranje dinamičke atmosfere. Treba posebno obratiti pozornost na izbjegavanje ponovnog udisanja u komorama za izlaganje samo nosom u slučajevima gdje je protok zraka kroz sustav za izlaganje neadekvatan za pružanje dinamičkog protoka atmosfere ispitivane kemikalije. Postoje propisane metodologije koje se mogu primijeniti kako bi se pokazalo da u odabranim uvjetima rada ne dolazi do ponovnog udisanja (2) (11). Koncentracija kisika mora iznositi najmanje 19 %, a koncentracija ugljikova dioksida ne smije premašivati 1 %. Ako postoji opravdana sumnja da se takvi standardi ne mogu postići, treba mjeriti koncentraciju kisika i ugljikova dioksida.

▼M4

Temperatura i relativna vlažnost zraka u komori

19. Temperaturu u komori treba održavati na 22 ± 3 °C. Relativnu vlažnost zraka u zoni gdje životinje dišu, za izlaganja samo nosom i čitavim tijekom, treba pratiti i bilježiti najmanje tri puta tijekom izlaganja do 4 sata te jedanput svakoga sata tijekom kraćih izlaganja. Relativnu vlažnost zraka trebalo bi idealno održavati u rasponu od 30 do 70 %, no to može biti nemoguće (npr. u slučaju ispitivanja smjesa na bazi vode) ili nemjerljivo zbog utjecanja na ispitivanu kemikaliju pomoću ispitne metode.

Ispitivana kemikalija: Nazivna koncentracija

20. Kad god je to moguće, treba izračunati i zabilježiti nazivnu koncentraciju u komori za izlaganje. Nazivna koncentracija jest masa proizvedene ispitivane kemikalije podijeljena s ukupnim volumenom zraka koji je prošao kroz sustav komore. Nazivna se koncentracija ne koristi za karakterizaciju izlaganja životinja nego usporedba nazivne koncentracije i stvarne koncentracije daje uvid u učinkovitost proizvodnje sustava ispitivanja te se stoga može upotrijebiti za otkrivanje problema pri proizvodnji.

Ispitivana kemikalija: Stvarna koncentracija

21. Stvarna koncentracija jest koncentracija ispitivane kemikalije u zoni udisanja životinja u komori za inhalaciju. Stvarna koncentracija može se dobiti specifičnim metodama (npr. izravnim uzorkovanjem, adsorpcijskim ili kemijskim reaktivnim metodama te analitičkom karakterizacijom nakon toga) ili nespecifičnim metodama, poput filtriranja u gravimetrijskoj analizi. Primjena gravimetrijske analize prihvatljiva je samo za aerosole sa samo jednom komponentom u prahu ili aerosole tekućina niskog stupnja hlapljivosti i treba je podržati odgovarajućom preliminarnom karakterizacijom specifičnom za ispitivanu kemikaliju. Gravimetrijskom analizom može se odrediti i koncentracija aerosola s višekomponentnim prahom. No, za to su potrebni analitički podaci koji pokazuju da je sastav materijala koji se prenosi zrakom sličan početnom materijalu. Ako ta informacija nije dostupna, potrebna je ponovna analiza ispitivane kemikalije (idealno u stanju kada se prenosi zrakom) u pravilnim intervalima tijekom ispitivanja. Za agense, pod utjecajem aerosola, koji mogu ispariti ili sublimirati treba pokazati da su odabranom metodom skupljene sve faze. U izvješću o ispitivanju treba navesti ciljanu, nazivnu i stvarnu koncentraciju, ali samo se stvarne koncentracije koriste u statističkim analizama za izračun vrijednosti smrtonosne koncentracije.

22. Ako je moguće, treba upotrijebiti jednu šaržu ispitivane kemikalije, a ispitivani uzorak treba skladištiti u uvjetima u kojima će biti očuvana njegova čistoća, homogenost i stabilnost. Prije početka ispitivanja treba odrediti svojstva ispitivane kemikalije, uključujući njezinu čistoću i, ako je tehnički izvedivo, identitet te količine identificiranih kontaminirajućih tvari i nečistoća. To se može pokazati sljedećim podacima, ali nije ograničeno na njih: vrijeme zadržavanja i relativno vršno područje, molekulska masa iz spektroskopskog mjerenja ili kromatografske analize plina ili sličnih procjena. Iako određivanje identiteta ispitivanog uzorka nije odgovornost ispitnog laboratorija, za laboratorij može biti mudro, barem u ograničenim okvirima, da potvrdi naručiteljevu karakterizaciju (npr. boju, fizikalnu prirodu itd.).

23. Atmosferu izlaganja treba održavati konstantnom koliko je to moguće i pratiti neprestano i/ili na mahove, ovisno o metodi analize. Ako se primjenjuje uzorkovanje na mahove, uzorke atmosfere u komori treba uzimati najmanje dvaput tijekom ispitivanja od četiri sata. Ako to nije izvedivo zbog ograničenog protoka zraka ili niskih koncentracija, tijekom čitavog razdoblja izlaganja može se uzeti jedan uzorak. Ako se pojave označene fluktuacije uzorak po uzorak, sljedeće ispitne koncentracije moraju

▼M4

upotrijebiti četiri uzorka po izlaganju. Pojedinačni uzorci koncentracije u komori ne smiju od srednje koncentracije odstupati za više od ± 10 % za plinove i pare ili ± 20 % za tekućine ili krute aerosole. Treba izračunati i zabilježiti vrijeme za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}). Trajanje izlaganja proteže se kroz vrijeme proizvodnje ispitivane kemikalije, a to uzima u obzir vrijeme potrebno za postizanje t_{95}. Smjernica za procjenu t_{95} može se pronaći u GD 39 (2).

24. Za vrlo složene smjese koje se sastoje od plinova/para i aerosole (npr. zapaljive atmosfere i ispitivane kemikalije izbačene iz namjenskih proizvoda/uređaja za krajnju uporabu) svaka se faza može ponašati drukčije u komori za inhalaciju tako da treba odabrati najmanje jedan indikator (analiziranu tvar), obično glavnu aktivnu tvar u smjesi, svake faze (plin/para i aerosol). Kada je ispitivana kemikalija smjesa, treba izvijestiti o analitičkoj koncentraciji smjese, a ne samo za aktivnu tvar ili komponentu (analiziranu tvar). Dodatne informacije o stvarnim koncentracijama mogu se pronaći u GD 39 (2).

Ispitivana kemikalija: Distribucija veličine čestica

25. Distribuciju veličine čestica u aerosolu treba odrediti najmanje dvaput tijekom svakog izlaganja od 4 sata uporabom kaskadnog impaktora ili alternativnog instrumenta, poput uređaja za aerodinamičku analizu veličine čestica. Ako se može dokazati da su rezultati dobiveni kaskadnim impaktorom ili alternativnim instrumentom ekvivalentni, u cijelom se istraživanju može upotrebljavati alternativni instrument. Drugi uređaj, poput gravimetrijskog filtra ili uređaja za sudaranje/uređaja za mjerenje mjehurića plina, treba upotrijebiti paralelno s primarnim instrumentom kako bi se potvrdila učinkovitost skupljanja primarnog instrumenta. Koncentracija mase dobivena analizom veličine čestica trebala bi biti u razumnim granicama koncentracije mase dobivene analizom filtracijom [vidjeti GD 39 (2)]. Ako se ekvivalentnost može dokazati u ranoj fazi istraživanja, mogu se izostaviti daljnja mjerenja radi potvrde. Radi dobrobiti životinja treba provoditi mjerenja kako bi se na minimum sveli nepotpuni podaci koji mogu dovesti do potrebe za ponovnim izlaganjem. Određivanje veličine čestica treba provesti za pare ako postoji ikakva mogućnost da bi kondenzacijom pare mogao nastati aerosol ili ako čestice detektirane u atmosferi pare imaju potencijal za miješane faze (vidjeti stavak 15.).

POSTUPAK

26. U nastavku su opisane dvije vrste istraživanja: tradicionalni protokol i protokol C × t. Oba protokola mogu uključivati preliminarno istraživanje, glavno istraživanje i/ili granični test (tradicionalni protokol) ili ispitivanje na graničnoj koncentraciji (C × t). Ako se za jedan od spolova zna da je osjetljiviji, voditelj istraživanja može odabrati da se ta istraživanja provedu samo na osjetljivom spolu. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanja izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Prije početka u obzir treba uzeti sve dostupne podatke kako bi se na minimum svela primjena životinja. Primjerice, podaci dobiveni primjenom Poglavlja B.52 ovog Priloga (4) mogu eliminirati potrebu za preliminarnim istraživanjem te također mogu pokazati je li jedan od spolova osjetljiviji [vidjeti GD 39 (2)].

▼M4

TRADICIONALNI PROTOKOL

Općenita razmatranja: Tradicionalni protokol

27. U tradicionalnom istraživanju skupine životinja izlažu se ispitivanoj kemikaliji na određeno vremensko razdoblje (općenito 4 sata) u komori za izlaganje samo nosom ili čitavim tijelom. Životinje se izlažu graničnoj koncentraciji (granični test) ili najmanje trima koncentracijama u postupku korak po korak (glavno istraživanje). Preliminarno istraživanje može prethoditi glavnom istraživanju, osim ako već ne postoje neke informacije o ispitivanoj kemikaliji, poput prethodno provedenog istraživanja B.52 [vidjeti GD 39 (2)].

Preliminarno istraživanje: Tradicionalni protokol

28. Preliminarno istraživanje primjenjuje se kako bi se procijenila snaga ispitivane kemikalije, identificirale razlike među spolovima po pitanju osjetljivosti te kako bi se pomoglo pri odabiru razina koncentracije pri izlaganju za glavno istraživanje ili granični test. Pri odabiru razina koncentracije za preliminarno istraživanje treba upotrijebiti sve dostupne informacije, uključujući dostupne podatke o (Q)SAR i podatke za slične kemikalije. Na svakoj koncentraciji treba izložiti najviše tri mužjaka i tri ženke (potrebne su tri životinje svakog spola kako bi se odredila razlika među spolovima). Preliminarno istraživanje može obuhvaćati samo jednu koncentraciju, ali, ako je potrebno, može se ispitivati više koncentracija. Preliminarno istraživanje ne smije obuhvaćati ispitivanje tolikog broja životinja i koncentracija da nalikuje glavnom istraživanju. Umjesto preliminarnog istraživanja može se upotrijebiti prethodno provedeno istraživanje B.52 (4) [vidjeti GD 39 (2)].

Granični test: Tradicionalni protokol

29. Granični test primjenjuje se kada se za ispitivanu kemikaliju zna ili očekuje da je zapravo netoksična, tj. izaziva toksične reakcije samo iznad regulatorne granične koncentracije. U graničnom testu jedna skupina od tri mužjaka i tri ženke izlaže se ispitivanoj kemikaliji na graničnoj koncentraciji. Informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije mogu se dobiti iz znanja o sličnim ispitivanim kemikalijama, uzimajući u obzir identitet i postotak komponenata za koje se zna da su od toksikološke važnosti. U takvim situacijama, u kojima postoji malo informacija o njezinoj toksičnosti ili ih uopće nema ili se za ispitivanu kemikaliju očekuje da je toksična, treba provesti glavno istraživanje.

30. Odabir graničnih koncentracija obično ovisi o regulatornim zahtjevima. Ako se primjenjuje Uredba (EZ) br. 1272/2008, granične koncentracije za plinove, pare i aerosole iznose redom 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (ili maksimalna koncentracija koja se može postići) (3). Tehnički može biti zahtjevno proizvesti granične koncentracije nekih ispitivanih kemikalija, posebno para i aerosola. Kada se ispituje aerosol, primarni cilj treba biti postizanje veličine čestica koja se može udahnuti (MMAD 1 - 4 μm). To je s većinom ispitivanih kemikalija moguće na koncentraciji od 2 mg/l. Ispitivanje aerosola na koncentraciji većoj od 2 mg/l treba pokušati samo ako se može postići veličina čestica koja se može udisati [vidjeti GD 39 (2)]. Uredba (EZ) br. 1272/2008 destimulira ispitivanja previše iznad granične koncentracije radi dobrobiti životinja (3). Graničnu koncentraciju treba uzeti u obzir samo ako postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti izravno relevantni za zaštitu ljudskog zdravlja (3) te ako je u izvješću o istraživanju navedeno obrazloženje. U slučaju potencijalno eksplozivnih ispitivanih kemikalija treba voditi brigu o tome da se izbjegnu uvjeti povoljni za eksploziju. Kako bi se izbjegla nepotrebna primjena životinja, prije graničnog testa treba provesti ispitivanje bez životinja kako bi se osiguralo da se u komori mogu postići uvjeti za granični test.

▼M4

31. Ako se na graničnoj koncentraciji opazi ugibanje ili krajnja iscrpljenost, rezultati graničnog testa mogu poslužiti kao preliminarno istraživanje za daljnje istraživanje na drugim koncentracijama (vidjeti glavno istraživanje). Ako fizikalna ili kemijska svojstva ispitivane kemikalije onemogućuju postizanje granične koncentracije, treba ispitati maksimalnu koncentraciju koja se može postići. Ako se na maksimalnoj koncentraciji koja se može postići dogodi smrtonosno djelovanje manje od 50 %, nije potrebno daljnje ispitivanje. Ako se granična koncentracija ne može postići, izvješće o istraživanju mora pružiti objašnjenje i podatke koji to potkrjepljuju. Ako maksimalna koncentracija pare koja se može postići ne izazove toksičnost, može biti potrebno proizvesti ispitivanu kemikaliju kao tekući aerosol.

Glavno istraživanje: Tradicionalni protokol

32. Glavno istraživanje obično se provodi uz primjenu pet mužjaka i pet ženki (ili 5 životinja osjetljivijeg spola ako je poznat) po razini koncentracije, s najmanje tri razine koncentracije. Za postizanje snažne statističke analize treba upotrijebiti dovoljan broj razina koncentracije. Vremensko razdoblje između izloženih skupina određuje se nastupom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Izlaganje životinja sljedećoj razini koncentracije treba odgoditi sve dok postoji opravdana mogućnost preživljavanja prethodno ispitivanih životinja. To voditelju istraživanja omogućuje prilagodbu ciljane koncentracije sljedećoj skupini koja će biti izložena. Zbog ovisnosti o sofisticiranoj tehnologiji to nije uvijek primjenjivo u inhalacijskim studijama pa se izlaganje životinja na sljedećoj razini koncentracije treba temeljiti na prethodnom iskustvu i znanstvenoj procjeni. U slučaju ispitivanja smjesa treba se konzultirati s GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRACIJA × VRIJEME (C × T)

Općenita razmatranja: Protokol C × t

33. Istraživanje C × t korak po korak može se smatrati alternativom tradicionalnom protokolu pri određivanju inhalacijske toksičnosti (12) (13) (14). Taj pristup životinjama omogućuje izlaganje ispitivanoj kemikaliji na više razina koncentracije i na više vremenskih razdoblja. Čitavo ispitivanje provodi se u komori za izlaganje samo nosom (komore za izlaganje čitavim tijelom nisu primjenjive za ovaj protokol). Dijagram toka u Dodatku 1. ilustrira ovaj protokol. Simulacijska analiza pokazala je da su i tradicionalni protokol i protokol C × t u stanju prikazati snažne vrijednosti LC_{50}, ali je protokol C × t općenito bolji u prikazivanju snažnih vrijednosti LC_{01} i LC_{10} (15).

34. Simulacijska analiza dokazala je da uporaba dviju životinja po intervalu C × t (po jedne od svakog spola ili po dvije osjetljivijeg spola) načelno može biti prikladna pri ispitivanju 4 koncentracije i 5 trajanja izlaganja u glavnom istraživanju. U određenim okolnostima voditelj istraživanja može odabrati uporabu dvaju štakora svakog spola za interval C × t (15). Uporabom 2 životinja svakog spola za koncentraciju i vremensku točku može se smanjiti pristranost i varijabilnost procjena, povećati stopa uspješnosti procjene te poboljšati obuhvaćenost intervalom pouzdanosti. Međutim, u slučaju nedovoljnog približavanja podacima za procjenu (u slučaju primjene jedne životinje svakog spola ili više životinja osjetljivijeg spola) može biti dovoljna i 5. koncentracija izlaganja. Daljnje upute u svezi s brojem životinja i koncentracijama koje treba primijeniti u istraživanju C × t nalaze se u GD 39 (2).

▼M4

Preliminarno istraživanje: Protokol C × t

35. Preliminarno istraživanje primjenjuje se za procjenu djelovanja ispitivane kemikalije te za pomoć pri odabiru razina koncentracije izlaganja u glavnom istraživanju. Preliminarno istraživanje uz primjenu do triju životinja po spolu i koncentraciji [za detalje vidjeti Dodatak III. GD 39 (2)] može biti potrebno za odabir prikladne početne koncentracije za glavno istraživanje te za svođenje broja upotrijebljenih životinja na minimum. Može biti potrebno upotrijebiti tri životinje svakog spola kako bi se odredila razlika među spolovima. Te se životinje trebaju izložiti jedanput, načelno 240 minuta. Izvedivost stvaranja prikladne atmosfere za ispitivanje treba ocijeniti tijekom tehničkih predispitivanja bez životinja. Preliminarno istraživanje načelno nije potrebno provoditi ako su podaci o smrtnosti dostupni iz istraživanja B.52 (4). Pri odabiru početne ciljane koncentracije u istraživanju B.2 voditelj istraživanja u obzir treba uzeti opažene uzorke smrtnosti u svim dostupnim istraživanjima B.52 (4) za oba spola i za sve ispitne koncentracije [vidjeti GD 39 (2)].

Početna koncentracija: Protokol C × t

36. Početna koncentracija (sesija izlaganja I.) (Dodatak 1.) bit će granična koncentracija ili koncentracija koju je odabrao voditelj istraživanja na temelju preliminarnog istraživanja. Skupine od 1 životinje po spolu izlažu se toj koncentraciji u više intervala (npr. 15, 30, 60, 120 ili 240 minuta) tako da se postigne ukupni broj od 10 životinja (takozvana sesija izlaganja I.) (Dodatak 1.).

37. Odabir graničnih koncentracija obično ovisi o regulatornim zahtjevima. Ako se primjenjuje Uredba (EZ) br. 1272/2008, granične koncentracije za plinove, pare i aerosole iznose redom 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (ili maksimalna koncentracija koja se može postići) (3). Tehnički može biti zahtjevno proizvesti granične koncentracije nekih ispitivanih kemikalija, posebno para i aerosola. U slučaju ispitivanja aerosola cilj treba biti postizanje veličine čestica koja se može udisati (npr. MMAD 1 - 4 μm) na graničnoj koncentraciji od 2 mg/l. To je moguće s većinom ispitivanih kemikalija. Ispitivanje aerosola na koncentraciji većoj od 2 mg/l treba pokušati samo ako se može postići veličina čestica koja se može udisati [vidjeti GD 39 (2)]. Uredba (EZ) br. 1272/2008 destimulira ispitivanja previše iznad granične koncentracije radi dobrobiti životinja (3). Ispitivanje previše iznad granične koncentracije treba uzeti u obzir samo ako postoji velika vjerojatnost da će rezultati takvog ispitivanja biti izravno relevantni za zaštitu ljudskog zdravlja (3), a u izvješću o ispitivanju treba navesti obrazloženje. U slučaju potencijalno eksplozivnih ispitivanih kemikalija treba voditi brigu o tome da se izbjegnu uvjeti povoljni za eksploziju. Kako bi se izbjegla nepotrebna primjena životinja, prije ispitivanja na početnoj koncentraciji treba provesti ispitivanje bez životinja kako bi se osiguralo da se u komori mogu postići uvjeti za tu koncentraciju.

38. Ako se na početnoj koncentraciji opazi ugibanje ili krajnja iscrpljenost, rezultati na toj koncentraciji mogu poslužiti kao početak za daljnje ispitivanje na drugim koncentracijama (vidjeti glavno istraživanje). Ako fizikalna ili kemijska svojstva onemogućuju postizanje granične koncentracije, treba ispitati maksimalnu koncentraciju koja se može postići. Ako se na maksimalnoj koncentraciji koja se može postići dogodi smrtonosno djelovanje manje od 50 %, nije potrebno daljnje ispitivanje. Ako se granična koncentracija ne može postići, izvješće o istraživanju mora pružiti objašnjenje i podatke koji to potkrjepljuju. Ako maksimalna koncentracija pare koja se može postići ne izazove toksičnost, može biti potrebno proizvesti ispitivanu kemikaliju kao tekući aerosol.

▼M4

Glavno istraživanje: Protokol C × t

39. Početna koncentracija (sesija izlaganja I.) (Dodatak 1.) ispitana u glavnom istraživanju bit će granična koncentracija ili koncentraciju koju je odabrao voditelj istraživanja na temelju preliminarnog istraživanja. Ako se tijekom sesije izlaganja I. ili nakon nje opazi smrtnost, minimalno izlaganje (C × t) koje izaziva smrtnost uzet će se kao smjernica za određivanje koncentracije i razdoblja izlaganja za sesiju izlaganja II. Svaka sljedeća sesija izlaganja ovisit će o prethodnoj sesiji (vidjeti Dodatak 1.).

40. Za mnoge ispitivane kemikalije rezultati dobiveni na početnoj koncentraciji zajedno s tri dodatne sesije izlaganja s manjim vremenskim rasterom (*npr.* geometrijski razmaci razdoblja izlaganja kao što je navedeno faktorom između uzastopnih razdoblja, načelno $\sqrt{2}$) bit će dovoljni za određivanje odnosa smrtnosti C × t (15), ali može biti korisno primijeniti 5. koncentraciju izlaganja [vidjeti Dodatak 1. i GD 39 (2)]. Za matematičku obradu rezultata za protokol C × t vidjeti Dodatak 1.

OPAŽANJA

41. Životinje treba često klinički promatrati tijekom razdoblja izlaganja. Nakon izlaganje klinička promatranja treba obavljati najmanje dvaput na dan izlaganja ili češće ako to zahtijeva reakcija životinja na tretman te najmanje jedanput dnevno u sljedećih 14 dana. Duljina razdoblja promatranja nije fiksno određena, ali treba je odrediti u skladu s prirodom i vremenom nastupanja kliničkih znakova i duljinom razdoblja oporavka. Važni su trenuci u kojima se pojavljuju i nestaju znakovi toksičnosti, posebno ako postoji tendencija ka kašnjenju znakova toksičnosti. Sva se opažanja sustavno bilježe u pojedinačnoj evidenciji za svaku životinju. Životinje u stanju ugibanja te životinje koje pokazuju znakove jake patnje i/ili trajne znakove ozbiljnog stresa treba humano usmrtiti radi njihove dobrobiti. Pri provođenju ispitivanja radi otkrivanja kliničkih znakova toksičnosti treba paziti na to da se početno slabo pojavljivanje i prolazne promjene u disanju, koje su rezultat postupka izlaganja, ne zamijene s toksičnošću povezanom s ispitivanom kemikalijom, što bi izazvalo prijevremeno usmrćivanje životinja. U obzir treba uzeti načela i kriterije sažete u Smjernici o humanom usmrćivanju (GD 19) (7). Ako se životinje usmrte zbog humanih razloga ili ih se pronađe uginule, vrijeme ugibanja treba zabilježiti što je moguće preciznije.

42. Promatranja u kavezu moraju obuhvaćati promjene na koži i krznu, očima i sluznicama te dišnom, cirkulacijskom, autonomnom i središnjem živčanom sustavu te somatomotoričkoj aktivnosti i uzorcima ponašanja. Ako je moguće, treba zamijetiti razliku između lokalnih i sistemskih učinaka. Treba obratiti pozornost na opažanje tremora, konvulzija, salivacije, dijareje, letargije, spavanja i kome. Mjerenje rektalne temperature može pružiti dodatne dokaze o refleksnoj bradipneji ili hipo/hipertermiji povezanima s tretmanom ili držanjem u zatvorenom.

Tjelesna masa

43. Pojedinačnu tjelesnu masu životinja treba zabilježiti jedanput tijekom razdoblja aklimatizacije, na dan izlaganja prije samog izlaganja (0. dana), barem 1., 3. i 7. dana (i jedanput tjedno nakon toga) te u trenutku ugibanja ili usmrćenja ako nastupe iza 1. dana. Tjelesna masa prepoznaje se kao kritični pokazatelj toksičnosti pa treba pobliže pratiti životinje kod kojih je primijećen neprekidan pad od $\geq$ 20 % u usporedbi s vrijednostima prije istraživanja. Životinje koje prežive važu se i humano usmrćuju na kraju razdoblja nakon izlaganja.

▼M4

Patologija

44. Sve pokusne životinje, uključujući i one koje su tijekom ispitivanja uginule ili usmrćene i uklonjene iz istraživanja radi svoje dobrobiti, treba podvrgnuti makroskopskoj obdukciji. Ako se obdukcija ne može provesti neposredno nakon otkrića uginule životinje, životinju treba ohladiti (ne zamrznuti) na dovoljno niskim temperaturama kako bi se razgradnja svela na minimum. Obdukciju treba provesti što je moguće prije, obično u roku od jednog ili dva dana. Za svaku životinju treba zabilježiti sve makroskopske patološke promjene uz poseban naglasak na promjenama u respiratornom traktu.

45. Dodatne pretrage, a priori obuhvaćene planom ispitivanja, mogu se uzeti u obzir radi proširenja interpretacijske vrijednosti istraživanja, poput mjerenja mase pluća preživjelih štakora i/ili pružanja dokaza o iritaciji pomoću mikroskopske pretrage respiratornog trakta. Ispitani organi također mogu obuhvaćati organe koji pružaju dokaze o makroskopskoj patologiji kod životinja koje su preživjele 24 sata ili dulje te organa za koje se zna ili očekuje da su pogođeni. Mikroskopska pretraga cijelog respiratornog trakta može pružiti korisne informacije za ispitivane kemikalije koje reagiraju s vodom, poput kiselina i higroskopskih ispitivanih kemikalija.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

46. Treba pribaviti pojedinačne podatke o tjelesnoj masi i nalazima obdukcije za svaku životinju. Podatke prikupljene kliničkim promatranjem treba sažeti u obliku tablice, koja za svaku ispitnu skupinu pokazuje broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje pokazuju specifične znakove toksičnosti, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme uginuća svake životinje, opis i vremenski tijek te reverzibilnost toksičnih učinaka i nalaze obdukcije.

Izvješće o ispitivanju

47. Izvješće o ispitivanju treba, ako je primjereno, sadržavati sljedeće informacije:

Pokusne životinje i njihov uzgoj

— opis uvjeta u kavezu, uključujući: broj (ili promjenu broja) životinja u svakom kavezu, materijal podloge, temperaturu i relativnu vlažnost zraka u kavezu, razdoblje svjetla i tame, identifikaciju prehrane,

— korištenu vrstu/soj i obrazloženje za uporabu druge vrste osim štakora,

— broj, dob i spol životinja,

— metodu nasumičnog odabira,

— detalje o kvaliteti hrane i vode (uključujući i vrstu/podrijetlo prehrane, izvor vode),

— opis kondicioniranja prije ispitivanja, uključujući i prehranu, karantenu i liječenje bolesti,

▼M4

Ispitivana kemikalija

— Fizikalna narav, čistoća te, ako je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući i izomerizaciju),

— Identifikacijski podaci i broj registracije *Chemical Abstract Services* (CAS), ako je poznat,

Nosač

— Obrazloženje za uporabu nosača i obrazloženje za odabir nosača (ako nije voda),

— Povijesni ili odgovarajući podaci koji pokazuju da nosač ne ometa rezultate istraživanja,

Komora za inhalaciju

— Opis komore za inhalaciju, uključujući i dimenzije i volumen,

— Podrijetlo i opis opreme korištene za izlaganje životinja te stvaranje atmosfere,

— Oprema za mjerenje temperature, vlažnosti, veličine čestica te stvarne koncentracije,

— Izvor zraka i obrada dovoda/odvoda zraka i sustav korišten za kondicioniranje,

— Metode korištene za kalibriranje opreme radi osiguravanja homogene atmosfere za ispitivanje,

— Razlika u tlaku (pozitivna ili negativna),

— Otvori za izlaganje po komori (samo nos), lokacija životinja u sustavu (čitavo tijelo),

— Privremena homogenost/stabilnost atmosfere za ispitivanje,

— Lokacija senzora temperature i vlažnosti te uzorkovanje ispitne atmosfere u komori,

— Brzine protoka zraka, otvor za brzinu protoka zraka po izlaganju (samo nos) ili dovod životinja po komori (čitavo tijelo),

— Informacije o opremi upotrijebljenoj za mjerenje kisika i ugljikova dioksida, ako je primjenjivo,

— Vrijeme potrebno za postizanje uravnoteženja u komori za inhalaciju (t_{95})

— Broj promjena u volumenu po satu,

— Uređaji za mjerenje (ako je primjenjivo),

Podaci o izlaganju

— Argumentacija za odabir ciljane koncentracije u glavnom istraživanju,

— Nazivne koncentracije (ukupna masa ispitivane kemikalije proizvedena u komori za inhalaciju podijeljena s volumenom zraka koji je prošao kroz komoru),

— Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije iz zone udisanja životinja; za smjese koje stvaraju heterogene fizikalne oblike (plinove, pare, aerosol) svaka se može analizirati odvojeno,

▼M4

— Sve koncentracije zraka moraju se prikazati u jedinicama mase (npr. mg/l, mg/m^3 itd.); i jedinice volumena (npr. ppm, ppb itd.) također se mogu usput prikazati,

— Distribucija veličine čestica, srednji aerodinamički promjer čestica (MMAD) te geometrijska standardna devijacija (σg), uključujući i metode za njihov izračun. Treba prijaviti pojedinačne analize veličine čestica,

Uvjeti ispitivanja

— Detalji o pripremi ispitivane kemikalije, uključujući i detalje o svim postupcima korištenima za smanjenje veličine čestica krutih tvari ili za pripremu otopina ispitivane kemikalije. U slučajevima u kojima su mehanički postupci mogli izmijeniti sastav ispitivane kemikalije uključiti rezultat analiza za utvrđivanje sastava ispitivane tvari,

— Opis (po mogućnosti uz dijagram) opreme korištene za stvaranje atmosfere za ispitivanje te izlaganje životinja atmosferi za ispitivanje,

— Detalji korištene kemijske analitičke metode i potvrda metode (uključujući učinkovitost rekuperacije ispitivane kemikalije iz medija za uzorkovanje),

— Argumentacija za odabir ispitnih koncentracija,

Rezultati

— Tablični prikaz temperature, vlažnosti zraka i protoka zraka u komori,

— Tablični prikaz podataka o nazivnoj i stvarnoj koncentraciji u komori,

— Tablični prikaz podataka o veličini čestica, uključujući i podatke o skupljenim analitičkim uzorcima, distribuciju veličina čestica te izračune MMAD i σ_g,

— Tablični prikaz podataka o reakciji i razini koncentracije za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti, uključujući smrtnost, prirodu, ozbiljnost, vrijeme nastupanja i trajanja učinaka),

— Individualne tjelesne mase životinja prikupljene tijekom istraživanja; datum i vrijeme uginuća ako je nastupilo prije planiranog usmrćenja, vremenski tijek nastupanja znakova toksičnosti te jesu li bili reverzibilni za svaku životinju,

— Nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju ako su dostupni,

— Procjena smrtonosnog djelovanja (npr. LC_{50}, LD_{01}), uključujući i granice pouzdanosti od 95 % te nagib (ako je dobiven metodom vrednovanja),

— Statistički odnos, uključujući i procjenu eksponenta n (protokol C × t). Treba navesti naziv korištenog statističkog softvera,

▼M4

Rasprava i tumačenje rezultata

— Poseban naglasak treba staviti na opis metoda korištenih za ispunjavanje kriterija ove ispitne metode, npr. graničnu koncentraciju ili veličinu čestica,

— Treba se pozabaviti sposobnošću udisanja čestica u svjetlu općih nalaza, posebno ako se nisu mogli ispuniti kriteriji za veličinu čestica,

— U slučaju humanog usmrćenja životinja koje su patile ili pokazivale znakove teškog ili trajnog stresa treba dati objašnjenje na temelju kriterija Smjernice za humano usmrćivanje OECD-a (8),

— Ako je ispitivanje s poglavljem B.52 ovog Priloga (4) prekinuto u korist ove ispitne metode B.2, treba pružiti obrazloženje,

— U opću ocjenu istraživanja treba uključiti dosljednost metoda korištenih za određivanje nazivnih i stvarnih koncentracija te odnos stvarne koncentracije prema nazivnoj,

— Treba se pozabaviti uzrokom smrti i prevladavajućim načinom djelovanja (sistemski u odnosu na lokalni).

LITERATURA

1. OECD (2009.). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

2. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

3. Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, kojom se izmjenjuju i dopunju te ukidaju Direktiva 67/548/EEZ i 1999/45/EZ te izmjenjuje i dopunjuje Uredba (EZ) br. 1907/2006, SL L 353, 31.12.2008., str. 1.

4. Poglavlje B.52 ovog Priloga, Akutna inhalacijska toksičnost - Metoda ATC (Acute Toxic Class).

5. Poglavlje B.40 ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test transkutanog električnog otpora (TER).

6. Poglavlje B.40 bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test na modelu ljudske kože.

7. OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

8. OECD (2000.). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

9. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

10. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

12. Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

13. Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

14. Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

15. OECD (2009.). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16. Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M4

Dodatak 1.

Protokol C × t

1. Istraživanje koncentracija × vrijeme (C × t) korak po korak može se smatrati alternativom tradicionalnom protokolu za određivanje inhalacijske toksičnosti (12) (13) (14). Treba mu dati prednost ako postoji specifična regulatorna ili znanstvena potreba za ispitivanjem životinja kroz više razdoblja, kao i za planiranje reakcije u slučaju nužde ili planiranje iskorištenja površina. Taj pristup obično počinje s ispitivanjem na graničnoj koncentraciji (sesija izlaganja I.), u kojem se životinje izlažu ispitivanoj kemikaliji pet puta (npr. 15, 30, 60, 120 i 240 minuta) tako da se tijekom jedne sesije izlaganja postigne više izlaganja (vidjeti sliku 1.). Ako se primjenjuje Uredba (EZ) br. 1272/2008, granične koncentracije za plinove, pare i aerosol iznose redom 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. Te razine smiju se prekoračiti samo u slučaju regulatorne ili znanstvene potrebe za ispitivanjem na tim razinama (vidjeti stavak 37. u glavnom tekstu B.2).

2. U situacijama u kojima ima malo informacija o toksičnosti ispitivane kemikalije ili ih uopće nema treba provesti preliminarno istraživanje u kojemu se skupine od najviše 3 životinje svakog spola izlažu ciljanim koncentracijama koje odabire voditelj istraživanja, općenito na 240 minuta.

3. Ako se tijekom sesije izlaganja I. ispituje granična koncentracija i ako se uoči smrtnost manja od 50 %, nije potrebno dodatno ispitivanje. Ako postoji regulatorna ili znanstvena potreba za određivanjem odnosa koncentracije, vremena, reakcije na višim razinama nego što pokazuje granična koncentracija, sljedeće izlaganje treba provesti na višoj razini jednakoj dvostrukoj graničnoj koncentraciji (npr. 2L na slici 1.).

4. Ako se na graničnoj koncentraciji uoči toksičnost, potrebno je dodatno ispitivanje (glavno istraživanje). Ta dodatna izlaganja mogu se provesti na nižim koncentracijama (na slici 1.: sesije izlaganja II., III. ili IV.') ili na višim koncentracijama uz kraće trajanje (na slici 1.: sesija izlaganja IV.) uz prilagođena i ne toliko razmaknuta trajanja.

5. Ispitivanje (početna koncentracija i dodatne koncentracije) provodi se uporabom jedne životinje svakog spola po koncentraciji i vremenskoj točki ili s dvije životinje osjetljivijeg spola po koncentraciji i vremenskoj točki. U određenim okolnostima voditelj istraživanja može odabrati primjenu dva štakora svakog spola po koncentraciji i vremenskoj točki (ili četiri životinje osjetljivijeg spola po koncentraciji i vremenskoj točki) (15). Uporabom dviju životinja po spolu po koncentraciji i vremenskoj točki može se općenito smanjiti pristranost i varijabilnost procjena, povećati stopa uspješnosti procjene te poboljšati obuhvaćenost intervalom pouzdanosti u odnosu na ovdje opisani protokol. Ostali detalji nalaze se u GD 39 (2).

6. U idealnom slučaju svaka sesija izlaganja provodi se jedan dan. Time se pruža mogućnost odgode sljedećeg izlaganja do opravdane mogućnosti preživljavanja, a voditelju istraživanja omogućuje se prilagođavanje ciljane koncentracije i trajanja sljedećoj sesiji izlaganja. Preporučuje se da se svaka sesija izlaganja započne sa skupinom koja će se najdulje izlagati, npr. skupinom koja će biti izložena 240 minuta, a zatim skupinom koja će biti izložena 120 minuta i tako dalje. Ako, primjerice, životinje u skupini izloženoj 240 minuta ugibaju nakon 90 minuta ili pokazuju jake znakove toksičnosti (npr. ekstremne promjene u uzorcima disanja poput otežana disanja), nema smisla izlagati skupinu do 120 minuta jer će smrtnost vjerojatno iznositi 100 %. Stoga voditelj istraživanja treba odabrati kraća izlaganja za tu koncentraciju (npr. 90, 65, 45, 33 i 25 minuta).

▼M4

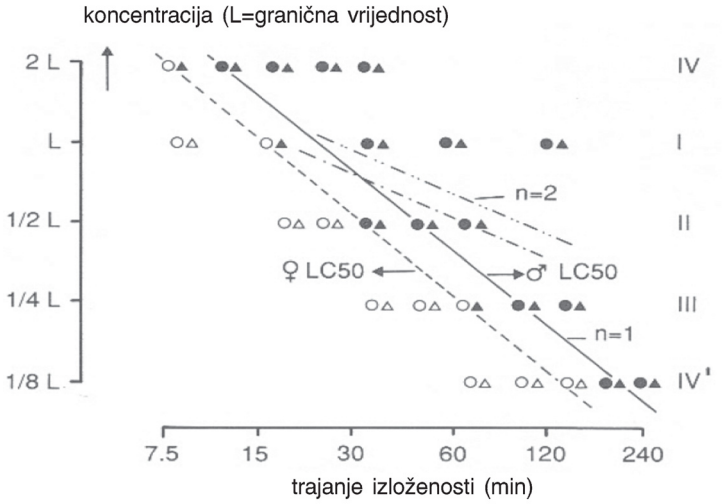
7. Koncentraciju u komori treba često mjeriti kako bi se odredio prosjek koncentracije u ovisnosti o vremenu za svako trajanje izlaganja. Kad god je to moguće, u statističkoj analizi treba upotrijebiti vrijeme ugibanja svake životinje (radije nego trajanje izlaganja).

8. Treba ispitati rezultate prvih četiriju sesija izlaganja kako bi se identificirale praznine u podacima u krivulji koncentracija-vrijeme (vidjeti sliku 1.). U slučaju nedovoljne prikladnosti može se provesti dodatno izlaganje (5. koncentracija). Koncentraciju i trajanje izlaganja za 5. izlaganje treba odabrati kako bi se pokrila ta praznina.

9. Sve sesije izlaganja (uključujući prvu sesiju izlaganja) upotrijebit će se za izračun odnosa koncentracije, vremena i reakcije primjenom statističke analize (16). Ako je moguće, za svaki interval C × t treba upotrijebiti prosječnu koncentraciju ponderiranu vremenom i trajanje izlaganja do uginuća (ako isto nastupi tijekom izlaganja).

Slika 1.

Hipotetska ilustracija odnosa koncentracija-vrijeme-smrtnost kod štakora



Otvoreni simboli = preživjeli; zatvoreni simboli = uginule životinje

Trokuti = ženke; krugovi = mužjaci

Puna linija = vrijednosti LC_{50} (interval 7,5 - 240 min) za mužjake s n = 1

Isprekidana linija = vrijednosti LC_{50} (interval 7,5 - 240 min) za ženke s n = 1

Istočkana linija = hipotetske vrijednosti LC_{50} za mužjake i ženke ako je n jednak 2 (12).

Pojmovnik

Koncentracija:

Vrijeme izlaganja:

▼M4

10. U nastavku slijedi primjer postupka korak po korak:

Sesija izlaganja I. – ***ispitivanje na graničnoj koncentraciji (vidjeti sliku 1.)***

— Jedna životinja po spolu po koncentraciji u vremenskoj točki; ukupno deset životinja ([a])

— Ciljana koncentracija ([b]) = granična koncentracija.

— Izlaganje pet skupina životinja na toj ciljanoj koncentraciji na vrijeme od redom 15, 30, 60, 120 i 240 minuta.

↓

Sesija izlaganja II. ([c])**–** ***glavno istraživanje***

— Jedna životinja po spolu po koncentraciji u vremenskoj točki; ukupno deset životinja.

— Izlaganje pet skupina životinja na nižoj koncentraciji ([d]) (1/2L) uz nešto dulje trajanje izlaganja (faktor razmaka √2; vidjeti sliku 1.).

↓

Sesija izlaganja III. – ***glavno istraživanje***

— Jedna životinja po spolu po koncentraciji u vremenskoj točki; ukupno deset životinja.

— Izlaganje pet skupina životinja na nižoj koncentraciji ([d]) (1/4L) uz nešto dulje trajanje izlaganja (faktor razmaka √2; vidjeti sliku 1.).

↓

Sesija izlaganja IV.′ – ***glavno istraživanje***

— Jedna životinja po spolu po koncentraciji u vremenskoj točki; ukupno deset životinja.

— Izlaganje pet skupina životinja na nižoj koncentraciji ([d]) (1/8L) uz nešto dulje trajanje izlaganja (faktor razmaka √2; vidjeti sliku 1.).

↓ ili

([a]) Ako nije dostupna informacija o osjetljivosti spolova, upotrijebit će se štakori oba spola, tj. 1 životinja svakog spola po koncentraciji. Na temelju postojećih informacija ili ako tijekom ove sesije izlaganja postane očito da je jedan od spolova osjetljiviji, upotrijebit će se deset životinja osjetljivijeg spola (dvije životinje po koncentraciji i vremenskoj točki) na svakoj razini koncentracije tijekom sljedećeg ispitivanja.

([b]) Ako se primjenjuje Uredba (EZ) br. 1272/2008, granične koncentracije za plinove, pare i aerosol iznose redom 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. U slučaju očekivane toksičnosti ili na temelju rezultata preliminarnih istraživanja treba odabrati niže početne koncentracije. U slučaju regulatornih ili znanstvenih potreba mogu se upotrijebiti više koncentracije.

([c]) U idealnom slučaju izlaganje životinja sljedećoj razini koncentracije treba odgoditi sve dok postoji opravdana mogućnost preživljavanja prethodno ispitivanih životinja. To voditelju istraživanja omogućuje prilagodbu ciljane koncentracije i trajanja za sljedeću sesiju izlaganja.

([d]) Minimalna doza (koncentracija × vrijeme) koja rezultira smrtnošću tijekom ispitivanja na početnoj koncentraciji (prva sesija izlaganja) uzet će se kao smjernica za određivanje sljedeće kombinacije koncentracije i trajanja izlaganja. Koncentracija će se tipično smanjivati upola (1/2L), a životinje će biti izložene kroz novo vremensko razdoblje s finijim razmakom uz primjenu geometrijske podjele razdoblja izlaganja s faktorom 1,4 (√2; vidjeti referencu 11.) oko vremena u skladu s minimalnom razinom smrtonosne doze (vrijeme × koncentracija) uočenoj tijekom prvog izlaganja. Na ovoj je slici (Slika 1.) smrtnost tijekom sesije izlaganja I. uočena tek u 15. minuti; stoga se trajanja sesije II. centriraju oko 30. minute i iznose 15, 21 30, 42 i 60 minuta. Nakon prva dva izlaganja preporučuje se da se podaci unesu u dijagram nalik gornjem dijagramu te da se provjeri je li odnos između koncentracije i vremena pod kutom od 45° (n = 1) ili je li odnos koncentracije, vremena i reakcije manje strm (npr. n = 2) ili strmiji (npr. n = 0,8). U posljednjim se slučajevima preporučuje da se u skladu s tim primjene sljedeće koncentracije i trajanja.

▼M4

Sesija izlaganja IV. – *glavno istraživanje*

— Jedna životinja po spolu po koncentraciji u vremenskoj točki; ukupno deset životinja.

— Izlaganje pet skupina životinja na višoj koncentraciji ([e]) (2L) uz nešto kraće trajanje izlaganja (faktor razmaka $\sqrt{2}$; vidjeti sliku 1.).

Matematička obrada rezultata za protokol C × t

11. Postupak C × t s 4 ili 5 koncentracija izlaganja i pet trajanja prikazat će 20 odnosno 25 podatkovnih točaka. S podatkovnim točkama može se izračunati odnos C × t uz primjenu statističke analize (16):

Jednadžba 1

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

gdje je C = koncentracija; t = trajanje izlaganja ili

Jednadžba 2

$$Response = f(C^n t)$$

gdje je $n = b_1/b_2$.

Primjenom jednadžbe 1 može se izračunati vrijednost LC_{50} za zadano razdoblje (npr. 4 sata, 1 sat, 30 minuta ili bilo koje razdoblje unutar ispitivanih razdoblja) uz primjenu P = 5 (reakcija 50 %). Obratite pozornost da se Haberovo pravilo može primijeniti samo ako je n = 1. LC_{01} može se izračunati primjenom P = 2.67.

([e]) U određenim slučajevima može biti nužno povećati koncentraciju (2L) kroz novo razdoblje s još finijim razmakom uz primjenu geometrijske podjele razdoblja izlaganja s faktorom 1,4 ($\sqrt{2}$) u blizini vremena u skladu s minimalnom razinom smrtonosne koncentracije uočenom tijekom prvog izlaganja. Minimalno trajanje izlaganja po mogućnosti treba biti dulje od 5 minuta; maksimalno trajanje izlaganja ne bi smjelo biti dulje od 8 sati.

▼B

B.3. **AKUTNA TOKSIČNOST (DERMALNA)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Korisno je imati preliminarne podatke o tvari kao što su raspored veličine čestica, tlak para, talište, vrelište, točka zapaljenja i eksplozivnost (ako je tvar eksplozivna).

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (A).

1.2. DEFINICIJE

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (B).

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana se tvar u stupnjevanim dozama nanosi na kožu nekoliko skupina pokusnih životinja, pri čemu se na svaku skupinu primjenjuje po jedna visina doze. Nakon tog opažaju se učinci i smrtnost. Životinje koje uginu tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a po završetku ispitivanja životinje koje su preživjele ispitivanje usmrćuju se i obduciraju.

Životinje koje pokazuju izrazite znakove stresa i boli treba humano usmrtiti. Ispitivane tvari ne smiju se primjenjivati na način za koji je poznato da životinjama uzrokuje znatnu bol i stres zbog snažnih nagrizajućih i nadražujućih svojstava.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Priprema**

Životinje se drže u kavezima za obavljanje ispitivanja, u pokusnim uvjetima što se tiče smještaja i hranjenja, najmanje pet dana prije početka pokusa. Prije ispitivanja zdrave mlade životinje nasumce se odabiru i raspoređuju u skupine u kojima će biti tretirane. Približno 24 sata prije ispitivanja na hrptenom dijelu trupa životinja treba ukloniti dlaku šišanjem ili brijanjem. Pri šišanju ili brijanju treba izbjeći struganje kože, jer bi to moglo promijeniti njezinu propusnost. Za nanošenje ispitivane tvari dlaku treba ukloniti s najmanje 10 % tjelesne površine. Pri ispitivanju krutih tvari koje se prema potrebi mogu usitniti u prah, ispitivanu tvar treba u dovoljnoj mjeri navlažiti vodom ili, tamo gdje je to potrebno, odgovarajućim nosačem, kako bi se osigurao dobar kontakt s kožom. Kad se upotrebljava nosač, u obzir treba uzeti utjecaj tog nosača na prodiranje ispitivane tvari u kožu. Tekuće ispitivane tvari općenito se primjenjuju nerazrijeđene.

1.6.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.6.2.1. *Pokusne životinje*

Mogu se koristiti odrasli štakori ili kunići. Moguće je koristiti i druge vrste, ali je za to potrebno navesti opravdane razloge. Treba koristiti sojeve životinja koji se obično koriste u laboratorijima. Na početku ispitivanja, bez obzira na spol, masa životinja ne smije varirati za više od ± 20 % odgovarajuće srednje vrijednosti.

▼B

1.6.2.2. *Broj i spol*

Za svaku visinu doze treba upotrijebiti najmanje pet životinja. Sve moraju biti istog spola. Ako se koriste ženke, treba koristiti one koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne. U slučajevima kad postoje informacije koje dokazuju da je jedan od spolova izrazito osjetljiviji, doze treba primjenjivati na životinje tog spola.

Napomena: kod ispitivanja akutne toksičnosti na životinjama višeg reda od glodavaca, treba razmotriti mogućnost upotrebe manjeg broja životinja. Treba pažljivo odabirati doze i poduzeti sve mjere da se ne premaše srednje toksične doze. U ovakvim ispitivanjima treba izbjegavati primjenu smrtonosnih doza ispitivane tvari.

1.6.2.3. *Visine doza*

Treba koristiti dovoljan broj različitih doza, najmanje tri, te ih primjenjivati u odgovarajućim vremenskim intervalima kako bi se na ispitnim skupinama mogli uočiti različiti toksički učinci i različite stope smrtnosti. Kod odabiranja visine doze treba uzeti u obzir nadražujuća i nagrizajuća svojstva ispitivane tvari. Ti podaci moraju biti dostatni da se na temelju njih izradi krivulja doza i reakcija i, kada je izvedivo, da omoguće prihvatljivo utvrđivanje vrijednosti LD_{50}.

1.6.2.4. *Granični test*

Na skupini od pet mužjaka i pet ženki može se obaviti granični test uz primjenu samo jedne visine doze, najmanje 2 000 mg/kg tjelesne mase, primjenjujući gore opisani postupak. U slučaju pojave smrtnosti povezane s ispitivanom tvari, možda će biti potrebna cijela studija.

1.6.2.5. *Razdoblje opažanja*

Razdoblje opažanja treba biti najmanje 14 dana. Međutim, trajanje opažanja ne treba biti strogo određeno. Treba ga odrediti na temelju toksičkih reakcija, brzine njihova pojavljivanja i vremena potrebnog za oporavak; ako se smatra potrebnim ono se može produžiti. Vrijeme pojavljivanja ili nestajanja znakova toksičnosti i vrijeme smrti su važni, posebno ako postoji tendencija kasnijeg nastupanja smrti.

1.6.3. **Postupak**

U kavezu treba držati po jednu životinju. Ispitivanu tvar treba jednakomjerno nanijeti na površinu koja čini oko 10 % ukupne površine tijela. Kad su u pitanju visoko toksične tvari, površina nanošenja može biti i manja, ali i na takvu površinu tvar treba nanijeti u što tanjem i ravnomjernijem sloju.

Ispitivanu tvar treba držati u kontaktu s kožom tijekom cijelog 24-satnog razdoblja izloženosti pomoću poroznog obloga od gaze i samoljepive trake koja ne nadražuje kožu. Ispitnu površinu treba dodatno prekriti na odgovarajući način kako bi oblog i ispitivana tvar ostali na mjestu i kako bi se osiguralo da životinje ne mogu ispitivanu tvar unijeti ingestijom (oralno). Da bi se životinju spriječilo da ispitivanu tvar unese ingestijom (oralnim putem) mogu se upotrijebiti pomagala za sputavanje, ali potpuna imobilizacija nije preporučena metoda.

▼B

Na kraju razdoblja izloženosti ostatke ispitivane tvari treba ukloniti, ako je moguće vodom ili primjenom neke druge prikladne metode čišćenja kože.

Rezultate opažanja treba sustavno bilježiti redoslijedom kojim se obavljaju. Za svaku životinju treba voditi zasebnu evidenciju. Tijekom prvog dana životinje treba opažati često. Najmanje jednom svakog radnog dana treba obaviti temeljiti klinički pregled, a ostala opažanja treba obavljati dnevno, uz poduzimanje odgovarajućih mjera kako bi se gubitak životinja tijekom studije sveo na minimum, npr. obdukcija ili pohranjivanje uginulih životinja u hladnjak i izolacija ili usmrćivanje slabih životinja i životinja na umoru.

Opažati treba promjene na dlaci, tretiranoj koži, očima i sluznicama, na dišnom i cirkulacijskom sustavu, te na autonomnom i centralnom živčanom sustavu, kao i promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i obrascu ponašanja. S posebnom pozornošću treba opažati drhtavicu, grčeve, slinjenje, proljev, otupjelost, san i komu. Vrijeme smrti mora se zabilježiti što je moguće preciznije. Životinje koje uginu tijekom ispitivanja kao i one koje prežive do kraja ispitivanja podvrgavaju se obdukciji. Treba zabilježiti sve veće patološke promjene. Kad za to postoje indikacije, treba uzeti uzorak tkiva za histopatološki pregled.

Ocjenjivanje toksičnosti kod drugog spola

Po završetku studije na jednom spolu doza se primjenjuje na najmanje jednu skupinu od pet životinja drugog spola kako bi se utvrdilo da životinje tog spola nisu izrazito osjetljivije na ispitivanu tvar. U određenim okolnostima može biti opravdano koristiti manji broj životinja. Ako već postoje odgovarajući podaci koji pokazuju da su životinje ispitanog spola izrazito osjetljivije, ispitivanje na životinjama drugog spola može se izostaviti.

2. **PODACI**

Podatke treba rezimirati u obliku tablice, u kojoj će za svaku ispitnu skupinu biti naveden broj životinja na početku ispitivanja, vrijeme smrti svake životinje, broj životinja koje pokazuju druge znakove toksičnosti, opis toksičkih učinaka i nalazi obdukcije. Masu svake pojedinačne životinje treba utvrditi i zabilježiti neposredno prije nanošenja ispitivane tvari, a zatim jednom tjedno i nakon smrti; promjene u masi treba izračunavati u slučajevima kad životinja preživi duže od jednog dana. Životinje koje se humano usmrte zbog stresa i boli izazvanih ispitivanom tvari svrstavaju se pod slučajeve smrti povezane s tom tvari. LD_{50} treba utvrditi prema nekoj od priznatih metoda.

Ocjena podataka treba uključivati eventualni odnos između izloženosti životinje ispitivanoj tvari i pojave i ozbiljnosti svih abnormalnosti, uključujući abnormalnosti u ponašanju, kliničke abnormalnosti, velike lezije, promjene u tjelesnoj masi, smrtnost i druge toksičke učinke.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, po mogućnosti, sadržavati slijedeće informacije:

▼B

— vrsta, soj, podrijetlo, okolišni uvjeti, prehrana itd.,

— uvjeti ispitivanja (uključujući metodu čišćenja kože i vrstu obloga: okluzivni ili neokluzivni),

— visine doza (s otapalom, ako se koristi, i koncentracijama),

— spol životinja kojima se tvar dozira,

— tabelarni prikaz podataka o reakcijama (tj. broj životinja koje su uginule ili bile usmrćene tijekom ispitivanja, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, broj izloženih životinja),

— sva opažanja,

— vrijednost LD_{50} za spol na kojem je provedena studija, utvrđena nakon 14 dana prema navedenoj metodi utvrđivanja,

— interval 95 %-tne pouzdanosti za LD_{50} (kad ga je moguće navesti),

— krivulja doza/smrtnost i nagib krivulje (gdje to dopušta metoda određivanja),

— nalazi obdukcije,

— svi histopatološki nalazi,

— rezultati svih ispitivanja na drugom spolu,

— diskusija o rezultatima (posebnu pozornost treba posvetiti mogućem učinku humanog usmrćivanja životinja tijekom ispitivanja na izračunanu vrijednost LD_{50}),

— tumačenje rezultata.

3.2. OCJENA I TUMAČENJE REZULTATA

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (D).

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (E).

▼M8

B.4. **AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE KOŽE**

UVOD

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

2. Definicije za nadraživanje i nagrizanje kože utvrđene su u Dodatku ovoj ispitnoj metodi.

POČETNA RAZMATRANJA

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

NAČELO IN VIVO ISPITIVANJA

4. Jedna doza ispitivane kemikalije nanosi se na kožu pokusne životinje; netretirani dijelovi kože ispitne životinje služe za kontrolu. Stupanj nadraženosti/nagriženosti očitava se i bilježi u određenim vremenskim intervalima i zatim se dodatno opisuje kako bi se mogla napraviti kompletna ocjena učinaka. Istraživanje treba trajati dovoljno dugo da bude moguće ocijeniti jesu li uočeni učinci reverzibilni ili ireverzibilni.

▼M8

5. Životinje koje pokazuju stalne znakove jakog stresa i/ili boli u bilo kojoj fazi ispitivanja treba humano usmrtiti te ispitivanu kemikaliju s tim u skladu ocijeniti. Kriteriji za donošenje odluke o humanom usmrćivanju životinja koje su na umoru i koje jako pate navedeni su u zasebnom dokumentu sa smjernicama (2.).

PRIPREME ZA IN VIVO ISPITIVANJE

Odabir životinjske vrste

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

Priprema životinja

7. Otprilike 24 sata prije ispitivanja životinjama se s leđnog dijela trupa uklanja dlaka šišanjem neposredno uz kožu. Pritom treba paziti da se koža ne ošteti te treba koristiti samo životinje sa zdravom, netaknutom kožom.

8. Kod nekih su sojeva kunića određeni dijelovi kože prekriveni vrlo gustom dlakom, što je posebno izraženo u određeno doba godine. Na takvima se gusto obraslim dijelovima kože ispitivanja ne bi smjela obavljati.

Uvjeti smještaja i hranjenja

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

ISPITNI POSTUPAK

Primjena ispitivane kemikalije

10. Ispitivanu kemikaliju treba nanijeti na malu površinu (približno 6 cm^2) kože i prekriti gazenom krpicom koju treba pričvrstiti nenadražujućom ljepljivom trakom. U slučajevima kad izravno nanošenje nije moguće (npr. tekućine ili neke paste) ispitivanu kemikaliju prvo treba nanijeti na gazenu krpicu koja se zatim stavlja na kožu. Krpicu treba držati labavo u kontaktu s kožom s pomoću odgovarajućeg poluokluzivnog obloga tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Ako se ispitivana kemikalija nanosi na krpicu, na kožu je treba pričvrstiti na takav način da se ostvari dobar kontakt između kemikalije i kože te da kemikalija bude jednoliko raspoređena po koži. Životinju treba spriječiti da dosegne krpicu te da kemikaliju unese u organizam gutanjem ili udisanjem.

11. Tekuće ispitivane kemikalije obično se koriste nerazrijeđene. Kad se ispituju krute tvari (koje mogu biti usitnjene u prah ako se smatra potrebnim), ispitivanu kemikaliju treba navlažiti najmanjom mogućom količinom vode (ili, prema potrebi, nekim drugim odgovarajućim nosačem) koja je dovoljna da omogući dobar kontakt s kožom. Kad se koriste drugi nosači, a ne voda, potencijalni utjecaj nosača na nadraženost kože izazvanu ispitivanom kemikalijom treba biti minimalan ili nikakav.

12. Na kraju razdoblja izlaganja, koje obično traje četiri sata, ostatke ispitivane kemikalije po mogućnosti treba ukloniti vodom ili odgovarajućim otapalom, ne mijenjajući nastao odgovor ili integritet površinskog sloja kože (epiderme).

▼M8

Visina doze

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

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

14. Ako se na temelju analize snage dokaza ili prethodnog *in vitro* ispitivanja utvrdi da je ispitivana kemikalija korozivna, nadražujuća ili nerazvrstana, daljnje *in vivo* ispitivanje obično nije potrebno. Međutim, u slučajevima u kojima se smatra da su potrebni dodatni podaci provodi se *in vivo* ispitivanje u kojem se prvo upotrebljava jedna životinja i primjenjuje se sljedeći pristup. Na kožu jedne životinje u slijedu se stavljaju najviše tri krpice. Prva se krpica uklanja nakon tri minute. Ako se na koži ne uoči jaka reakcija, na drugo se mjesto stavlja druga krpica koja se uklanja nakon jednog sata. Ako se na temelju opažanja u ovoj fazi može zaključiti da ne bi bilo nehumano produžiti izlaganje, stavlja se treća krpica koja se uklanja nakon četiri sata i utvrđuje stupanj odgovora.

15. Ako se nakon bilo kojeg od tri izlaganja u nizu opazi nagrizajuće djelovanje, ispitivanje se odmah prekida. Ako se nakon uklanjanja posljednje krpice ne uoči nagrizajuće djelovanje, životinja se opaža 14 dana, osim u slučaju da do nagrizanja dođe ranije.

16. U slučajevima kad se ne očekuje da će ispitivana kemikalija uzrokovati nagrizanje, ali da može biti nadražujuća, treba na jednu životinju staviti jednu krpicu i držati je četiri sata.

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

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

Razdoblje opažanja

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

Klinička opažanja i stupnjevanje reakcija na koži

19. Sve životinje treba pregledati kako bi se vidjelo pokazuju li znakove crvenila kože (eritema) ili oteklina (edema) i to nakon 60 minuta, a zatim nakon 24, 48 i 72 sata po skidanju krpice. Za početno ispitivanje na jednoj životinji mjesto ispitivanja pregledava se i odmah nakon uklanjanja krpice. Stupanj reakcije na koži utvrđuje se i bilježi prema stupnjevima opisanim u tablici u nastavku. Ako se na koži pojavi oštećenje koje se nakon 72 sata ne može

▼M8

definirati kao nadraženost ili nagriženost, možda će za utvrđivanje reverzibilnosti učinaka biti potrebno opažanje u trajanju od 14 dana. Uz opažanja povezana s nadraženosti kože treba detaljno opisati i zabilježiti sve lokalne toksične učinke, kao što je isušivanje kože, i sve sustavne štetne učinke (npr. klinički znakovi toksičnosti i promjene u tjelesnoj masi). U slučaju dvosmislenih odgovora trebalo bi razmotriti mogućnost histopatološkog pregleda.

20. Stupnjevanje odgovora na koži po svojoj je prirodi subjektivno. Da bi se poboljšala usklađenost u stupnjevanju odgovora na koži te da bi se u tom smislu pomoglo ispitnim laboratorijima i onima koji obavljaju opažanja i tumače rezultate, osoblje koje obavlja ta opažanja treba proći odgovarajuće osposobljavanje za primjenu sustava ocjenjivanja (vidjeti tablicu u nastavku). Od pomoći bi mogao biti ilustrirani priručnik za utvrđivanje stupnja nadraženosti i drugih lezija kože (3.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

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

Ocjena rezultata

22. Pokazatelje nadraženosti kože treba ocijeniti ovisno o vrsti i stupnju lezija te o njihovoj reverzibilnosti ili ireverzibilnosti. Pojedinačni rezultati ne predstavljaju apsolutni standard za nadražujuća svojstva određenog ispitnog materijala, s obzirom na to da se ocjenjuju i drugi njegovi učinci. Umjesto toga, na pojedinačne rezultate treba gledati kao na referentne vrijednosti koje se ocjenjuju u kombinaciji sa svim ostalim opažanjima iz istraživanja.

23. Kod ocjenjivanja nadraženosti kože treba uzeti u obzir reverzibilnost lezija. Ako reakcije kao što su alopecija (ograničena površina), hiperkeratoza, hiperplazija i perutanje ostanu prisutne do kraja 14-dnevnog razdoblja opažanja, ispitivanu kemikaliju treba smatrati nadražujućom.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

Razlozi za ispitivanje in vivo:

— analiza snage dokaza postojećih podataka dobivenih prethodnim ispitivanjima, uključujući rezultate dobivene primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja,

— opis relevantnih podataka dobivenih ranijim ispitivanjima,

— podaci dobiveni u svakoj fazi primijenjene strategije ispitivanja,

— opis obavljenih *in vitro* ispitivanja, uključujući pojedinosti o postupcima i rezultate dobivene ispitivanjem ispitivanih/referentnih tvari,

— analiza snage dokaza radi provođenja istraživanja *in vivo*.

Ispitivana kemikalija:

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

▼**M8**

— tvar s više sastojaka, smjesa i tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali (UVCB): opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

Nosač:

— identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,

— obrazloženje za odabir nosača.

Ispitne životinje:

— upotrijebljena vrsta/soj, razlozi za upotrebu drugih životinja umjesto albino kunića,

— broj životinja svakog spola,

— tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i na kraju ispitivanja,

— dob na početku istraživanja,

— podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Ispitni uvjeti:

— tehnika pripremanja mjesta na koje će se staviti krpica,

— pojedinosti o upotrijebljenim materijalima i tehnici stavljanja krpice,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije, nanošenju i uklanjanju.

Rezultati:

— tablični prikaz stupnjeva nadražujućeg/nagrizajućeg odgovora za svaku životinju u svakoj vremenskoj točki u kojoj se provodi opažanje,

— opis svih uočenih lezija,

— detaljni opis vrste i stupnja uočene nadraženosti ili nagrizanja i svi histopatološki nalazi,

— opis drugih štetnih lokalnih (npr. isušivanje kože) i sustavnih učinaka koji se javljaju pored nadraživanja i nagrizanja kože.

▼**M8**

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, studeni 1998.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

Tablica

Utvrđivanje Stupnja Reakcije na Koži

Nastanak eritema i eshara (crvenila kože i krasta)

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

Najviši mogući stupanj: 4

Nastanak edema

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

Najviši mogući stupanj: 4

U slučaju dvosmislenih odgovora može se obaviti histopatološki pregled.

▼**M8**

Dodatak

DEFINICIJE

Kemikalija je tvar ili smjesa.

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

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

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

▼M7

B.5. AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE OKA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 405 (2012.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemijskih tvari periodički se preispituju kako bi se osiguralo da odražavaju najbolje dostupne znanstvene spoznaje. U prethodnim preispitivanjima ovih smjernica za ispitivanje posebna je pozornost posvećena mogućim poboljšanjima u smislu procjenjivanja svih postojećih informacija o ispitivanoj kemikaliji kako bi se izbjeglo nepotrebno ispitivanje na laboratorijskim životinjama i time pridonijelo njihovoj dobrobiti. Smjernica za ispitivanje 405 (donesena 1981. te ažurirana 1987., 2002. i 2012.) sadržava preporuku da se prije provođenja opisanog *in vivo* ispitivanja akutnog nagrizajućeg/nadražujućeg djelovanja tvari na oko provede analiza snage dokaza (1.) na temelju postojećih relevantnih podataka. Ako nema dovoljno raspoloživih podataka, preporučuje se njihovo prikupljanje primjenom sekvencijskog ispitivanja (2., 3.). Strategija ispitivanja uključuje provođenje validiranih i prihvaćenih ispitivanja *in vitro*, a opisana je u Dodatku ovoj ispitnoj metodi. Za potrebe Uredbe (EZ) br. 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) ([1]), integrirana strategija ispitivanja navedena je i u odgovarajućoj smjernici ECHA-e (21.). Ispitivanje na životinjama trebalo bi provoditi samo ako se utvrdi da je ono potrebno nakon razmatranja dostupnih alternativnih metoda i primjene onih za koje se utvrdi da su primjerene. U vrijeme izrade ove ažurirane ispitne metode još uvijek postoje slučajevi u kojima je primjena ove ispitne metode potrebna ili je propisana određenim regulatornim okvirima.

Zadnje se ažuriranje uglavnom odnosilo na upotrebu analgetika i anestetika te se njime nije mijenjala osnovna zamisao i struktura smjernice za ispitivanje. ICCVAM ([2]) i međunarodni nezavisni odbor za stručnu reviziju preispitali su korisnost i ograničenja rutinske primjene lokalnih anestetika, sustavnih analgetika te humanih krajnjih točaka tijekom *in vivo* ispitivanja nadražujućeg djelovanja tvari na oko (12.). Zaključili su da bi se primjenom lokalnih anestetika i sustavnih analgetika moglo većim dijelom ili u cijelosti izbjeći bol i patnju bez utjecaja na ishod ispitivanja te su preporučili da bi te tvari trebalo uvijek primjenjivati. U ovoj se ispitnoj metodi uzimaju u obzir zaključci tog preispitivanja. Lokalne anestetike, sustavne analgetike i humane krajnje točke trebalo bi rutinski primjenjivati tijekom *in vivo* ispitivanja akutnog nagrizanja/nadraživanja oka. Iznimke u pogledu njihove primjene trebaju biti opravdane. Poboljšanjima opisanima u ovoj metodi značajno će se smanjiti ili izbjeći bol i patnja životinja u većini ispitnih okolnosti u kojima je još uvijek potrebno *in vivo* ispitivanje sigurnosti za oči.

U uravnoteženu preventivnu kontrolu boli trebalo bi uključiti: i. rutinsko davanje lokalnog anestetika (npr. proparakaina ili tetrakaina) i sustavnog analgetika (npr. buprenorfina) prije tretiranja, ii. rutinski program tretiranja sustavnim analgetikom (npr. buprenorfinom i meloksikamom) nakon tretiranja, iii. program promatranja, praćenja i bilježenja kliničkih znakova boli i/ili patnje kod životinja te iv. program promatranja, praćenja i bilježenja vrste, težine i napredovanja svih ozljeda očiju. Dodatne su pojedinosti navedene u ažuriranim postupcima opisanima u nastavku. Nakon primjene ispitivane kemikalije ne bi se smjeli davati

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

([2]) *The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Međuagencijski koordinacijski odbor SAD-a za validaciju alternativnih metoda)

▼M7

nikakvi dodatni lokalni anestetici ili analgetici kako ne bi utjecali na ispitivanje. Analgetike s protuupalnim djelovanjem (npr. meloksikam) ne bi trebalo primjenjivati lokalno, a doze koje se primjenjuju sustavno ne bi smjele utjecati na učinke na oči.

Definicije su navedene u Dodatku ovoj ispitnoj metodi.

POČETNA RAZMATRANJA

Kako bi se osigurala pouzdanost znanstvenih rezultata i dobrobit životinja, *in vivo* ispitivanja ne bi smjela doći u obzir sve dok se analizom snage dokaza ne ocijene svi raspoloživi podaci koji su relevantni za moguće nagrizajuće/nadražujuće djelovanje predmetne kemikalije na oko. Takvi podaci obuhvaćaju dokaze koji proizlaze iz postojećih studija provedenih na ljudima i/ili laboratorijskim životinjama, dokaze o nagrizajućim/nadražujućim svojstvima jedne ili više strukturno srodnih tvari ili smjesa tih tvari, podatke koji ukazuju na jaku kiselost ili lužnatost kemikalije (4., 5.) i rezultate validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja nagrizanja kože i nagrizanja/nadraživanja oka (6., 13., 14., 15., 16., 17.). Te su studije mogle biti provedene prije analize snage dokaza ili na temelju te analize.

Kod nekih kemikalija takva analiza može upućivati na potrebu za *in vivo* ispitivanjem potencijala kemikalije za nagrizanje/nadraživanje oka. U svim je takvim slučajevima poželjno da se prije razmatranja primjene *in vivo* ispitivanja na oku ispita nagrizajuće djelovanje kemikalije na kožu *in vitro* i/ili *in vivo* te da se dobiveni rezultati ocijene u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja iz ispitne metode B.4. (7.) ili integriranom strategijom ispitivanja koja je opisana u smjernici ECHA-e (21.).

Strategija sekvencijskog ispitivanja, koja uključuje provođenje validiranih *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja nagrizanja/nadraživanja oka, navedena je u Dodatku ovoj ispitnoj metodi te, za potrebe Uredbe REACH, u smjernicama ECHA-e (21). Preporučuje se slijediti tu strategiju ispitivanja prije provođenja ispitivanja *in vivo*. Ako je riječ o novim kemikalijama, preporučuje se stupnjevito ispitivanje kako bi se dobili znanstveno pouzdani podaci o nagrizajućim/nadražujućim svojstvima kemikalije. Ako je riječ o postojećim kemikalijama o čijem nagrizanju/nadraživanju kože i oka nema dovoljno podataka, strategija se može primijeniti kako bi se popunile praznine u podacima. Primjenu drukčije strategije ili postupka ispitivanja ili odluku da se ne primijeni metoda stupnjevitog ispitivanja potrebno je opravdati.

NAČELO *IN VIVO* ISPITIVANJA

Nakon davanja sustavnog analgetika te odgovarajuće lokalne anestezije jedna doza ispitivane kemikalije nanese se na jedno oko pokusne životinje; netretirano oko služi za kontrolu. Stupanj nadraživanja/nagrizanja oka ocjenjuje se na temelju zabilježenih lezija očne spojnice (sluznice), rožnice i šarenice u određenim intervalima. Opisuju se i ostale promjene na oku, kao i neželjene sustavne promjene, kako bi se osigurala kompletna procjena djelovanja tvari. Ispitivanje treba trajati dovoljno dugo da se ocijeni reverzibilnost ili ireverzibilnost učinaka.

Životinje koje pokazuju znakove jake patnje i/ili boli u bilo kojoj fazi ispitivanja ili lezije koje odgovaraju humanim krajnjim točkama opisanima u ovoj ispitnoj metodi (vidjeti stavak 26.) treba humano usmrtiti, a ispitivanu tvar ocijeniti u skladu s tim. Kriteriji za donošenje odluke o humanom usmrćivanju životinja koje su na umoru i koje jako pate navedeni su u smjernici OECD-a (8.).

▼M7

PRIPREME ZA *IN VIVO* ISPITIVANJE

Odabir vrste

Kao pokusne životinje preporučuje se upotrijebiti albino kuniće, i to zdrave mlade odrasle primjerke. Ako se upotrebljavaju neke druge subpopulacije ili vrste životinja, potrebno je navesti razloge za to.

Priprema životinja

Oba oka svake pokusne životinje odabrane za ispitivanje treba pregledati unutar 24 sata prije početka ispitivanja. Životinje kod kojih se utvrdi nadraženost oka, očni defekti ili već postojeća ozljeda rožnice ne smiju se upotrijebiti.

Uvjeti smještaja i hranjenja

Životinje treba smjestiti pojedinačno. Ako je riječ o kunićima, temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 20 °C (± 3 °C). Iako relativna vlažnost zraka treba iznositi najmanje 30 % i po mogućnosti ne više od 70 %, osim za vrijeme čišćenja prostorije, treba je nastojati održavati na 50 – 60 %. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Potrebno je izbjegavati prejako osvjetljenje. Što se tiče hranjenja, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine pitke vode.

ISPITNI POSTUPAK

Upotreba lokalnih anestetika i sustavnih analgetika

Preporučuju se sljedeći postupci za sprječavanje ili smanjenje boli i patnje pri ispitivanju sigurnosti za oči. Mogu se primijeniti i zamjenski postupci za koje je dokazano da su isto toliko djelotvorni ili djelotvorniji u sprječavanju ili smanjenju boli i patnje životinja.

— Šezdeset minuta prije primjene ispitivane kemikalije potkožnom se injekcijom (SC) daje buprenorfin u dozi od 0,01 mg/kg kako bi se postigla terapijska razina sustavne analgezije. Nije poznato ili se ne očekuje da će buprenorfin i drugi slični opioidni analgetici koji se sustavno primjenjuju mijenjati očne reakcije (12.).

— Pet minuta prije primjene ispitivane kemikalije u svako se oko ukapaju jedna ili dvije kapi lokalnog očnog anestetika (npr. proparakain hidroklorida od 0,5 % ili tetrakain hidroklorida od 0,5 %). Kako bi se izbjegle moguće interferencije s pokusom, preporučuje se upotreba lokalnog anestetika koji ne sadržava konzervanse. Oko svake životinje koje nije tretirano ispitivanom kemikalijom, ali je tretirano lokalnim anestetikom, služi za kontrolu. Ako se očekuje da će ispitivana kemikalija izazvati znatnu bol i patnju, u uobičajenim je okolnostima ne bi trebalo ispitivati *in vivo*. Međutim, ako postoji sumnja ili ako je ispitivanje potrebno, potrebno je razmotriti dodatne primjene lokalnog anestetika u razmacima od pet minuta prije primjene ispitivane kemikalije. Korisnici moraju biti svjesni činjenice da bi višestruka primjena lokalnih anestetika mogla izazvati blago povećanje ozbiljnosti lezija izazvanih kemikalijom i/ili vremena potrebnog da te lezije nestanu.

— Osam sati nakon primjene ispitivane kemikalije potkožno se ubrizgavaju buprenorfin u dozi od 0,01 mg/kg i meloksikam u dozi od 0,5 mg/kg kako bi se osigurala stalna terapijska razina sustavne analgezije. Iako ne postoje podaci koji upućuju na to da meloksikam ima protuupalne učinke na oko ako se primijeni potkožno jednom dnevno, trebalo bi ga dati tek nakon što prođe najmanje osam sati od primjene ispitivane kemikalije kako bi se izbjegla moguća ometanja ispitivanja (12.).

— Nakon početnog tretmana koji je uslijedio osam sati nakon primjene ispitivane kemikalije, buprenorfin se ubrizgava potkožno svakih 12 sati u dozi od 0,01 mg/kg, uz potkožno ubrizgavanje meloksikama svaka 24 sata u dozi od

▼M7

0,5 mg/kg, sve dok ne dođe do regresije lezija oka i dok ne bude prisutan nijedan klinički znak boli i patnje. Dostupni su preparati analgetika s produženim otpuštanjem pa bi moglo razmotriti njihovu primjenu kako bi se smanjila učestalost davanja analgetika.

— „Spasonosnu” analgeziju potrebno je dati odmah nakon primjene ispitivane kemikalije ako se pokaže da su preventivna analgezija i lokalna anestezija nedostatne. Ako životinja pokaže znakove boli i patnje tijekom ispitivanja, bez odlaganja joj se potkožno ubrizgava „spasonosna” doza buprenorfina od 0,03 mg/kg te se ta doza ponavlja svakih osam sati, ako je potrebno, umjesto potkožnog ubrizgavanja 0,01 mg/kg svakih 12 sati. Uz „spasonosnu” dozu buprenorfina svaka se 24 sata potkožno ubrizgava i meloksikam u dozi od 0,5 mg/kg, pri čemu s njegovom primjenom treba započeti tek nakon što prođe osam sati od primjene ispitivane kemikalije.

Primjena ispitivane kemikalije

Ispitivanu kemikaliju treba staviti u konjunktivalnu vrećicu jednog oka svake životinje, pri čemu donji kapak treba lagano odmaknuti od očne jabučice. Kapke zatim treba lagano držati spojenima oko jedne sekunde da bi se spriječilo istjecanje materijala. Drugo oko koje se ne tretira služi za kontrolu.

Ispiranje

Oči pokusnih životinja ne smiju se ispirati najmanje 24 sata od primjene ispitivane kemikalije, osim ako je riječ o krutim tvarima (vidjeti stavak 18.) te u slučaju da odmah dođe do nagrizajućeg ili nadražujućeg djelovanja. Nakon 24 sata oči se mogu isprati, ako se to smatra potrebnim.

Upotreba satelitske skupine životinja za istraživanje utjecaja ispiranja ne preporučuje se ako za to ne postoji znanstveno opravdanje. Ako je satelitska skupina potrebna, treba upotrijebiti dva kunića. Uvjete ispiranja treba detaljno dokumentirati, npr. vrijeme ispiranja; sastav i temperatura otopine za ispiranje; trajanje, volumen i brzina primjene otopine.

Visina doze

1. *Ispitivanje tekućina*

Za ispitivanje tekućina primjenjuje se doza od 0,1 ml. Sprejevi na pumpicu ne smiju se upotrebljavati za primjenu kemikalija izravno na oko. Ako je tekućina u spreju, najprije je treba istisnuti u posudu, iz nje uzeti 0,1 ml i nakapati u oko.

2. *Ispitivanje krutih tvari*

Kad se ispituju krute tvari, paste i kemikalije u obliku čestica, volumen upotrijebljene doze treba iznositi 0,1 ml, odnosno njezina masa ne smije biti veća od 100 mg. Ispitivanu kemikaliju potrebno je usitniti u fini prah. Volumen krutog materijala treba izmjeriti nakon što se lagano natisne, npr. lupkanjem po mjernoj posudi. Ako se pri prvom opažanju jedan sat nakon tretiranja utvrdi da kruta ispitna kemikalija nije uklonjena iz oka pokusne životinje djelovanjem fizioloških mehanizama, oko se može isprati fiziološkom otopinom ili destiliranom vodom.

3. *Ispitivanje aerosola*

U slučaju sprejeva na pumpicu i aerosola, prije kapanja u oko preporučuje se tekućinu staviti u posudu. Jedini izuzetak čine kemikalije u obliku aerosola pod tlakom koje se u posudu ne mogu staviti zbog hlapljenja. U takvim slučajevima oko treba držati otvorenim i ispitivanu kemikaliju nanijeti na oko jednostavnim prskanjem u trajanju od oko jedne sekunde, s udaljenosti od 10 cm ravno ispred oka. Ova razdaljina može varirati ovisno o tlaku i sadržaju spreja. Mora se paziti da ne dođe do oštećenja oka koje može izazvati tlak spreja. U nekim slučajevima može biti potrebno procijeniti mogućnost „mehaničkih” ozljeda oka koje bi mogao izazvati jaki mlaz iz spreja.

▼M7

Procjena doze iz aerosola može se napraviti simuliranjem testa na sljedeći način: kemikalija se naspreja na papir za vaganje kroz otvor veličine oka kunića postavljen ravno ispred papira. Povećanje težine papira približno odgovara količini tekućine koja se naspreja u oko. Kod hlapljivih kemikalija doza se može procijeniti vaganjem posude u koju se naspreja ispitivana kemikalija prije i nakon pražnjenja posude.

Inicijalni test (ispitivanje nadraživanja/nagrizanja oka *in vivo* na jednoj životinji)

Čvrsto se preporučuje da se *in vivo* ispitivanje prvo provede samo na jednoj životinji (vidjeti dodatak ovoj ispitnoj metodi: Strategija sekvencijskog ispitivanja nadraživanja i nagrizanja oka). Zapažanja iz tog ispitivanja trebala bi omogućiti određivanje težine i reverzibilnosti lezija prije provođenja potvrdnog testa na dodatnoj životinji.

Ako rezultati tog testa pokažu da uz primjenu opisanog postupka kemikalija djeluje na oko nagrizajuće ili jako nadražujuće, daljnja ispitivanja nadraživanja oka ne smiju se provoditi.

Potvrdni test (ispitivanje nadraživanja/nagrizanja oka *in vivo* na dodatnim životinjama)

Ako se tijekom inicijalnog testa ne opazi nagrizajuće ili jako nadražujuće djelovanje, nadražujuću ili negativnu reakciju potrebno je potvrditi upotrebljavajući do dvije dodatne životinje. Ako se tijekom inicijalnog testa opazi nadražujući učinak, preporučuje se da se potvrdni test izvede sekvencijski na jednoj po jednoj životinji, a ne da se istodobno izlože dvije dodatne životinje. Ako se na drugoj životinji otkrije nagrizajuće ili jako nadražujuće djelovanje, ispitivanje se ne nastavlja. Ako su rezultati testa na dodatnoj životinji dovoljni da omoguće svrstavanje tvari u kategoriju opasnosti, ne provode se daljnja ispitivanja.

Razdoblje promatranja

Promatranje treba trajati dovoljno dugo da se u potpunosti može utvrditi jačina i reverzibilnost opaženih učinaka. Međutim, pokus treba prekinuti čim životinja počne pokazivati znakove jake boli ili patnje (8.). Da bi se utvrdila reverzibilnost učinaka, životinje obično treba promatrati 21 dan od primjene ispitivane kemikalije. Ako se reverzibilnost uoči prije isteka 21 dana, pokus odmah treba prekinuti.

Klinička opažanja i stupnjevanje reakcija oka

Sat vremena nakon primjene ispitivane kemikalije oči treba sveobuhvatno pregledati kako bi se utvrdila moguća prisutnost očnih lezija, a potom preglede treba ponavljati najmanje jednom dnevno. Tijekom prva tri dana životinje treba pregledavati nekoliko puta dnevno kako bi se osiguralo pravovremeno donošenje odluke o prekidu pokusa. Tijekom cjelokupnog trajanja ispitivanja pokusne životinje treba rutinski pregledavati kako bi se provjerilo pokazuju li kliničke znakove boli i/ili patnje (npr. ponavljajuće grebanje šapom ili trljanje oka, pretjerano treptanje, pretjerano suzenje) (9., 10., 11.), i to najmanje dva puta dnevno u razmacima od najmanje šest sati ili češće ako je potrebno. Ta su pregledavanja potrebna kako bi se i. pravilno procijenilo pokazuju li životinje znakove boli i patnje te na temelju činjeničnog stanja donijela odluka o tome treba li povećati doziranje analgetika te ii. ocijenilo jesu li kod životinja dosegnute humane krajnje točke te na temelju činjeničnog stanja donijela odluka je li primjereno humano eutanazirati životinje, osiguravajući pritom da ta odluka bude donesena pravodobno. Kako bi se oštećenja očiju mogla lakše otkriti i izmjeriti te kako bi se

▼M7

ocijenilo jesu li dosegnute utvrđene krajnje točke za humanu eutanaziju, potrebno je rutinski primjenjivati bojenje fluoresceinom te upotrebljavati biomikroskop s procjepnom svjetiljkom kada se to smatra potrebnim (npr. za procjenu dubine lezije u slučaju ulceracije rožnice). Mogu se prikupiti digitalne fotografije uočenih lezija koje će služiti u referentne svrhe te biti trajan zapis o opsegu oštećenja očiju. Životinje ne treba držati u uvjetima ispitivanja duže nego što je potrebno za dobivanje konačnih rezultata. Životinje koje pokazuju znakove jake boli ili patnje treba bez odlaganja humano usmrtiti, a kemikaliju ocijeniti u skladu s tim.

Životinje kod kojih se nakon primjene tvari uoče sljedeće lezije oka treba humano usmrtiti (u tablici 1. nalazi se opis stupnjeva lezija): perforacija ili znatna ulceracija rožnice, uključujući stafilom; krv u prednjoj očnoj komori; zamućenje rožnice 4. stupnja; nedostatak svjetlosnog refleksa (reakcija šarenice 2. stupnja) u trajanju od 72 sata; ulceracija konjunktivalne membrane; nekroza očne spojnice (konjunktive) ili trećeg kapka (*membrana nictitans*); ili ljuštenje. To se poduzima zato jer takve lezije uglavnom nisu reverzibilne. Nadalje se preporučuje da se sljedeće lezije očiju upotrebljavaju kao humane krajnje točke za prekid ispitivanja prije isteka planiranog razdoblja promatranja od 21 dana. Te se lezije smatra pretkazateljima teških oštećenja nastalih zbog nadražujućeg ili nagrizajućeg učinka tvari te oštećenja za koje se ne očekuje da će se u cijelosti povući do kraja razdoblja promatranja od 21 dana: vrlo duboke lezije (npr. ulceracija rožnice koja prodire dublje od površinskih slojeva strome), oštećenje limbusa > 50 % (koje dokazuje bljedilo konjunktivalnog tkiva) te teška infekcija oka (gnojni iscjedak). Istodobna pojava vaskularizacije površine rožnice (tj. panusa) te površine obojene fluoresceinom za koju je dnevnim pregledima utvrđeno da se ne smanjuje tijekom vremena i/ili izostanka ponovne epitelizacije pet dana nakon primjene ispitivane kemikalije mogu isto tako, u kombinaciji, biti korisni kriteriji za donošenje kliničke odluke o prijevremenom prekidu ispitivanja. Međutim, navedeni nalazi promatrani zasebno nisu dovoljni da opravdaju prijevremeni prekid ispitivanja. Nakon što se utvrde teški učinci na oči, potrebno je obratiti se veterinaru koji vodi brigu o pokusnim životinjama ili je specijalist za pokusne životinje ili osoblju koje je osposobljeno za prepoznavanje kliničkih lezija kako bi izvršili klinički pregled i utvrdili zahtijeva li kombinacija tih učinaka prijevremeni prekid ispitivanja. Nakon jednog, 24, 48 i 72 sata od primjene ispitivane kemikalije potrebno je odrediti i zabilježiti stupnjeve reakcija oka (očne spojnice, rožnice i šarenice) (tablica 1.). Životinje kod kojih se ne pojave očne lezije mogu se usmrtiti najranije tri dana nakon primjene ispitivane kemikalije. Životinje kod kojih očne lezije nisu teške treba promatrati dok lezije ne nestanu ili 21 dan, nakon čega se ispitivanje prekida. Promatranja treba izvršiti i zabilježiti najmanje nakon jednog, 24, 48 i 72 sata te sedmog, 14. i 21. dana kako bi se utvrdilo stanje lezija i njihova reverzibilnost ili ireverzibilnost. Ako je potrebno, promatranja treba provoditi češće kako bi se utvrdilo treba li pokusne životinje eutanazirati iz humanih razloga ili ih ukloniti iz ispitivanja zbog negativnih rezultata.

Stupnjeve reakcija oka (tablica 1.) treba zabilježiti pri svakom pregledu. Isto tako treba zabilježiti sve druge lezije oka (npr. panus, obojenje, promjene prednje komore), kao i sustavne štetne učinke.

Pregled reakcija može se olakšati upotrebom binokularne lupe, ručne procjepne svjetiljke, biomikroskopa i drugih prikladnih pomagala. Nakon bilježenja opažanja nakon 24 sata, oči se mogu dodatno pregledati s pomoću fluoroesceina.

Stupnjevanje očnih reakcija po svojoj je prirodi subjektivno. Da bi se poboljšala usklađenost u stupnjevanju očnih reakcija te da bi se u tom smislu pomoglo ispitnim laboratorijima i svima koji sudjeluju u promatranjima i tumačenju rezultata, osoblje koje provodi promatranja treba proći odgovarajuću obuku o sustavu ocjenjivanja koji se primjenjuje.

▼M7

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Ocjena rezultata

Vrijednosti za nadraženost očiju treba ocijeniti ovisno o vrsti i stupnju lezija te o njihovoj reverzibilnosti ili ireverzibilnosti. Pojedinačne vrijednosti ne predstavljaju apsolutni standard za nadražujuća svojstva kemikalije jer se ocjenjuju i drugi učinci ispitivane kemikalije. Umjesto toga, na pojedinačne vrijednosti treba gledati kao na referentne vrijednosti koje imaju značenje samo ako su potkrijepljene potpunim opisom i ocjenom svih opažanja.

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Razlozi za ispitivanje in vivo: analiza snage dokaza postojećih podataka dobivenih prethodnim ispitivanjima, uključujući rezultate dobivene primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja:

— opis relevantnih podataka dobivenih ranijim ispitivanjima,

— podaci dobiveni u svakoj fazi strategije ispitivanja,

— opis provedenih *in vitro* ispitivanja, uključujući pojedinosti o postupku i rezultate dobivene ispitivanjem ispitivane/referentne kemikalije,

— opis obavljenog *in vivo* ispitivanja nadraživanja/nagrizanja kože, uključujući dobivene rezultate,

— analiza težine dokaza radi provođenja ispitivanja *in vivo*.

Ispitivana kemikalija:

— identifikacijski podaci (npr. kemijski naziv te CAS broj, ako je dostupan, čistoća, poznate nečistoće, izvor, broj serije),

— fizikalno stanje i fizikalno-kemijska svojstva (npr. pH, hlapljivost, topljivost, stabilnost, reaktivnost s vodom),

— ako je riječ o smjesi, potrebno je identificirati njezin sastav te navesti podatke za identifikaciju tvari koje čine smjesu (npr. kemijske nazive te CAS brojeve ako su dostupni) te njihove koncentracije,

— primijenjena doza.

Nosač:

— identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,

— obrazloženje za odabir nosača,

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta/subpopulacija, razlozi za upotrebu drugih životinja umjesto albino kunića,

— starost svake životinje na početku ispitivanja,

— broj životinja svakog spola u ispitnim i kontrolnim skupinama (prema potrebi),

— tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i na kraju ispitivanja,

— podrijetlo životinja, uvjeti držanja, prehrana itd.

▼M7

Anestetici i analgetici

— doze i vrijeme primjene lokalnih anestetika i sustavnih analgetika,

— ako se upotrebljava lokalni anestetik, identifikacijska oznaka, čistoća, vrsta i moguća interakcija s ispitivanom kemikalijom.

Rezultati:

— opis upotrijebljene metode za utvrđivanje vrijednosti za nadraženost kod svakog opažanja (npr. ručna procjepna svjetiljka, biomikroskop, fluorescein),

— tablični prikaz podataka o reakcijama na nadraživanje/nagrizanje za svaku životinju kod svakog opažanja sve do isključivanja životinje iz ispitivanja,

— narativni opis stupnja i vrste opažene nadraženosti ili nagriženosti,

— opis svih drugih lezija opaženih na oku (npr. vaskularizacija, formiranje panusa, adhezije, obojenost),

— opis neželjenih lokalnih i sustavnih učinaka koji nisu na oku, zapis o kliničkim znakovima boli i patnje, digitalne fotografije i histopatološki nalazi, ako postoje.

Rasprava o rezultatima

Tumačenje rezultata

Ekstrapolacija rezultata ispitivanja nadraživanja oka kod laboratorijskih životinja na ljude valjana je samo do određene granice. U mnogim su slučajevima albino kunići osjetljiviji od ljudi na tvari koje nadražuju ili nagrizaju oči.

Pri tumačenju podataka treba paziti da se isključi nadraženost uzrokovana sekundarnom infekcijom.

LITERATURA

Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410. – 429.

de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159. – 164.

Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161. – 177.

Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19. – 26.

Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227. – 231.

Fentem, J.H., *et al.* (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, str.483. – 524.

Poglavlje B.4. ovog Priloga, *Akutno nadraživanje/nagrizanje kože*.

▼M7

OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20. – 36.

10. National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

11. National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

12. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

13. Poglavlje B.40. ovog Priloga, *Nagrizanje kože in vitro: test transkutanog električnog otpora (TER)*.

14. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, *Nagrizanje kože in vitro: test na modelu ljudske kože*.

15. OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

16. Poglavlje B.47. ovog Priloga, Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

17. Poglavlje B.48. ovog Priloga, Metoda ispitivanja na izoliranim očima pilića za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

18. U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

19. UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

20. EZ (2008.), Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, izmjeni i stavljanju izvan snage direktiva 67/548/EEZ i 1999/45/EZ te izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006. *Službeni list Europske unije* L353, 1. – 1355.

21. ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_
r7a_en.pdf

▼M7

Tablica 1.

Stupnjevanje očnih lezija

Rožnica	Stupanj
Zamućenost: stupanj neprozirnosti (treba očitati vrijednosti za najneprozirniji dio rožnice) (*)	
Nema ulceracije ni zamućenosti	0
Razbacana ili difuzna područja zamućenosti (osim blagog zamućenja normalnog sjaja); detalji šarenice jasno vidljivi	1
Jasno vidljiva prozirna područja; detalji šarenice lagano zasjenjeni	2
Sedefasta područja; nisu vidljivi detalji šarenice; veličina zjenice jedva vidljiva	3
Zamućena rožnica: šarenica se ne razaznaje zbog zamućenosti	4
Najviši mogući stupanj: 4	
Šarenica	
Normalno	0
Izrazito produbljeni nabori, kongestija, oteklina, umjerena hiperemija oko rožnice; ili injekcija; šarenica reagira na svjetlo (usporena reakcija smatra se učinkom ispitivane tvari)	1
Krvarenje, veliko oštećenje, ili nema reakcije na svjetlo	2
Najviši mogući stupanj: 2	
Očna spojnica (konjunktiva)	
Crvenilo (odnosi se na palpebralnu i bulbarnu konjunktivu; isključujući rožnicu i šarenicu)	
Normalno	0
Neke krvne žile hiperemične (ubrizgano)	1
Difuzna, skarletno crvena boja; pojedinačne žile ne mogu se jasno razaznati	2
Difuzno tamno crvenilo (boje mesa)	3
Najviši mogući stupanj: 3	
Kemoza	
Oteklina (odnosi se na kapak i/ili treći kapak)	
Normalno	0
Oteklina nešto iznad uobičajenog stanja	1
Očita oteklina, s djelomičnim iskretanjem kapka prema van (everzija)	2
Oteklina, kapak napola zatvoren	3
Oteklina, kapak više od napola zatvoren	4
Najviši mogući stupanj: 4	

(*) Područje zamućenosti rožnice treba zabilježiti.

▼M7

Dodatak

DEFINICIJE

Kisela/alkalna rezerva: Za pripravke na osnovi kiseline, to je količina (g) natrijeva hidroksida/100 g pripravka potrebna da se dobije određena pH-vrijednost. Za alkalne pripravke, to je količina (g) natrijeva hidroksida koja odgovara količini (g) sumporne kiseline/100 g pripravka potrebnoj da se dobije određena pH-vrijednost (Young *et al*. 1988.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Nenadražujuće tvari: Tvari koje nisu razvrstane kao tvari nadražujuće za oko I., II. ili III. kategorije EPA-e; ili kao tvari nadražujuće za oči 1., 2., 2.A ili 2.B kategorije GHS-a; ili 1.ili 2. kategorije EU-a (17., 18., 19.).

Tvar nagrizajuća za oči: (a) Kemikalija koja uzrokuje ireverzibilno oštećenje očnog tkiva; (b) Kemikalije koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči 1. kategorije GHS-a ili I. kategorije EPA-e ili 1. kategorije EU-a (17., 18., 19.).

Tvar nadražujuća za oči: (a) Kemikalija koja dovodi do reverzibilne promjene u oku; (b) Kemikalije koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči II. ili III. kategorije EPA-e; ili kao tvari nadražujuće za oči 2., 2.A ili 2.B kategorije GHS-a; ili 2. kategorije EU-a (17., 18., 19.).

Tvar jako nadražujuća za oči: (a) Kemikalija koja uzrokuje oštećenje očnog tkiva koje nije reverzibilno unutar 21 dana od primjene ili uzrokuje ozbiljno fizičko pogoršanje vida; (b) Kemikalije koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči 1. kategorije GHS-a ili I. kategorije EPA-e ili 1. kategorije EU-a (17., 18., 19.).

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Višerazinski pristup: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ispitivanoj kemikaliji ne može pripisati potencijal za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevitog sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Ocjenjivanje snage dokaza (postupak): Prednosti i mane skupa informacija upotrebljavaju se kao osnova za donošenje zaključka koji možda nije očit iz pojedinačnih podataka.

▼M7

DODATAK ISPITNOJ METODI B.5. ([1])

STRATEGIJA SEKVENCIJSKOG ISPITIVANJA NADRAŽIVANJA I NAGRIZANJA OKA

Opća razmatranja

Kako bi se osigurala pouzdanost znanstvenih rezultata i dobrobit životinja, važno je izbjegavati nepotrebnu upotrebu životinja te svesti na najmanju mjeru ispitivanja koja bi mogla uzrokovati teške reakcije kod životinja. Prije donošenja odluke o *in vivo* ispitivanju potrebno je procijeniti sve informacije o kemikaliji koje se odnose na njezino moguće nadraživanje/nagrizanje oka. Možda već postoji dovoljno dokaza na temelju kojih se ispitivana kemikalija može razvrstati s obzirom na njezin potencijal nagrizanja ili nadraživanja oka, bez potrebe za provođenjem ispitivanja na laboratorijskim životinjama. Prema tome, primjenom analize snage dokaza i strategije sekvencijskog ispitivanja potreba za *in vivo* ispitivanjima svodi se na minimum, posebno ako postoji vjerojatnost da će kemikalija izazvati teške reakcije.

Preporučuje se primijeniti analizu snage dokaza kako bi se ocijenile postojeće informacije o nadražujućem i nagrizajućem djelovanju kemikalija na oko te utvrdilo je li potrebno provesti dodatna istraživanja koja ne uključuju *in vivo* ispitivanja na oku, a koja bi pomogla u karakterizaciji takvog potencijala. Ako su potrebna dodatna istraživanja, preporučuje se primijeniti strategiju sekvencijskog ispitivanja za dobivanje relevantnih eksperimentalnih podataka. Ako je riječ o tvarima koje nikada nisu bile podvrgnute ispitivanjima, strategiju sekvencijskog ispitivanja trebalo bi primijeniti za dobivanje podataka potrebnih za ocjenjivanje njihova nagrizanja/nadraživanja oka. Prva verzija strategije ispitivanja opisane u ovom Dodatku razvijena je u okviru OECD-ove radionice (1.). Kasnije je potvrđena i proširena u sklopu Usklađenog integriranog sustava za klasifikaciju opasnosti od štetnog djelovanja kemijskih tvari na ljudsko zdravlje i okoliš, koji je odobren na 28. zajedničkom sastanku Odbora za kemikalije i radne skupine za kemikalije, održanom u studenome 1998. (2.), a u 2011. ažurirala ju je radna skupina OECD-a.

Iako ova strategija ispitivanja nije sastavni dio ispitne metode B.5., ona odražava preporučeni pristup utvrđivanju nadražujućeg/nagrizajućeg djelovanja tvari na oči. Taj pristup predstavlja najbolju praksu i etičko mjerilo za *in vivo* ispitivanja nadraživanja/nagrizanja oka. Ova ispitna metoda sadržava smjernice za izvođenje *in vivo* ispitivanja te sažeti prikaz čimbenika koje je potrebno razmotriti prije započinjanja takvog ispitivanja. Kod strategije sekvencijskog ispitivanja postojeći podaci o nadražujućem/nagrizajućem djelovanju kemikalija na oko ocjenjuju se na temelju analize snage dokaza, a za dobivanje relevantnih podataka o kemikalijama za koje su potrebna dodatna istraživanja ili za koje istraživanja još nisu provedena primjenjuje se višerazinski pristup. Prema toj strategiji prvo se provode validirana i prihvaćena *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja, a potom istraživanja prema ispitnoj metodi B.4. u posebnim okolnostima (3., 4.).

Opis strategije stupnjevitog ispitivanja

Prije provođenja ispitivanja u okviru strategije sekvencijskog ispitivanja (Slika) potrebno je ocijeniti sve raspoložive informacije kako bi se utvrdilo je li *in vivo* ispitivanje na oku uopće potrebno. Iako se ocjenjivanjem pojedinačnih parametara mogu dobiti važne informacije (npr. ekstremni pH), postojeće je informacije potrebno procijeniti u cijelosti. Kod donošenja odluke na temelju ocjenjivanja

([1]) Za primjenu integrirane strategije ispitivanja nadražujućeg djelovanja tvari na oči u skladu s Uredbom REACH vidjeti i ECHA-ine Smjernice o zahtjevima obavješćivanja i procjeni kemijske sigurnosti, poglavlje R.7a: Smjernice o pojedinim krajnjim točkama http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

snage dokaza treba ocijeniti sve relevantne podatke o djelovanju predmetne kemikalije i njezinih strukturnih analoga te navesti na čemu se odluka temelji. Naglasak prije svega treba staviti na postojeće podatke o djelovanju kemikalije na ljude i životinje, a potom na rezultate *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja. Kad god je to moguće, treba izbjegavati *in vivo* istraživanja nagrizajućih kemikalija. U strategiji ispitivanja razmatraju se sljedeći čimbenici:

Ocjenjivanje postojećih podataka o djelovanju tvari na ljude i/ili životinje i/ili podataka dobivenih *in vitro* validiranim i međunarodno prihvaćenim metodama (1. stupanj)

Prvo treba razmotriti postojeće podatke o djelovanju kemikalije na ljude, npr. kliničke studije i studije izloženosti na radnom mjestu, izvješća o pojedinim slučajevima i/ili podatke dobivene ispitivanjima na životinjama u okviru ispitivanjâ o djelovanju na oči i/ili podatke dobivene *in vitro* s pomoću validiranih i međunarodno prihvaćenih metoda ispitivanja nadraživanja/nagrizanja očiju, jer pružaju informacije koje se izravno odnose na djelovanje na oči. Nakon toga treba ocijeniti raspoložive podatke dobivene istraživanjima nadraživanja/nagrizanja kože koja su provedena na ljudima i/ili životinjama i/ili validiranim i međunarodno prihvaćenim metodama *in vitro* istraživanja nagrizanja kože. U oči životinja ne smiju se stavljati kemikalije za koje se zna da nagrizaju ili jako nadražuju oči, kao ni tvari koje pokazuju nagrizajuće ili jako nadražujuće djelovanje na kožu; treba smatrati da će takve tvari nagrizati i/ili nadraživati i oči. Kemikalije za koje na temelju prijašnjih istraživanja na očima postoji dovoljno dokaza za to da nemaju nagrizajuća i nadražujuća svojstva isto tako ne bi trebalo ispitivati na oku *in vivo*.

Analiza odnosa strukture i djelovanja (SAR) (2. stupanj).

Treba uzeti u obzir rezultate ispitivanja strukturno srodnih kemikalija, ako takvi postoje. Ako ima dovoljno podataka o djelovanju strukturno srodnih tvari ili smjesa takvih tvari na ljude i/ili životinje, iz kojih je vidljiv njihov potencijal za nagrizanje/nadraživanje očiju, može se pretpostaviti da će ispitivana kemikalija izazvati iste reakcije. U takvim se slučajevima može utvrditi da kemikaliju nije potrebno ispitivati. Negativni rezultati dobiveni istraživanjima strukturno srodnih tvari ili smjesa takvih tvari nisu dovoljan dokaz da kemikalija nije nagrizajuća/nadražujuća u okviru strategije sekvencijskog ispitivanja. Za utvrđivanje potencijala tvari da nagriza i nadražuje kožu i oči potrebno je primijeniti validirane i prihvaćene metode analize SAR.

Fizikalno-kemijska svojstva i kemijska reaktivnost (3. stupanj).

Tvari koje pokazuju ekstremne pH-vrijednosti, kao npr. $\leq$ 2,0 ili $\geq$ 11,5, mogu imati jake lokalne učinke. Ako je ekstremna pH-vrijednost osnova za identificiranje kemikalije kao nagrizajuće ili nadražujuće za oči, onda se isto tako može uzeti u obzir njezina kisela/alkalna rezerva (puferski kapacitet) (5., 6., 7.). Ako puferski kapacitet upućuje na to da kemikalija možda ne nagriza oči (tj. kemikalije s ekstremnom pH-vrijednošću i niskom kiselom/alkalnom rezervom), potrebno je provesti dodatna ispitivanja kako bi se to potvrdilo, po mogućnosti primjenom validiranog i prihvaćenog *in vitro* ili *ex vivo* testa (vidjeti stavak 10.).

Razmatranje drugih postojećih informacija (4. stupanj).

U ovoj fazi treba proučiti sve raspoložive informacije o sustavnoj toksičnosti kod primjene dermalnim putem. Isto tako treba uzeti u obzir i akutnu dermalnu toksičnost ispitivane kemikalije. Ako se pokazalo da je ispitivana kemikalija vrlo toksična kod primjene dermalnim putem, može se zaključiti da je nije potrebno ispitivati na očima. Iako ne mora uvijek postojati povezanost između

▼M7

akutne dermalne toksičnosti i nadraživanja/nagrizanja oka, može se pretpostaviti da će neko sredstvo koje je vrlo toksično kad se primjenjuje dermalnim putem isto tako pokazati visoku toksičnost ako se nakapa u oko. Takvi se podaci isto tako mogu razmatrati između faza 2. i 3.

Procjena sposobnosti kemikalije da nagriza kožu, ako se ta procjena zahtijeva i u regulatorne svrhe (5. stupanj).

Potencijal kemikalije da nagriza i jako nadražuje kožu potrebno je ocijeniti prvo u skladu s ispitnom metodom B.4. (4.) i njezinim Dodatkom (8.), uključujući primjenu validiranih i međunarodno prihvaćenih metoda *in vitro* ispitivanja nagrizanja kože (9., 10., 11.). Ako se pokaže da kemikalija nagriza ili jako nadražuje kožu, može se smatrati da nagriza i jako nadražuje i oči. Dodatna ispitivanja stoga nisu potrebna. Ako kemikalija nije nagrizajuća ili jako nadražujuća za kožu, potrebno je provesti *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanje na očima.

Rezultati *in vitro* ili *ex vivo* ispitivanja (6. stupanj).

Kemikalije koje su pokazale nagrizajuća ili jaka nadražujuća svojstva u *in vitro* ili *ex vivo* testu (12., 13.) koji je validiran i međunarodno prihvaćen posebno za ocjenjivanje nagrizajućeg/nadražujućeg djelovanja na oči nije potrebno ispitivati na životinjama. Može se pretpostaviti da će takve kemikalije proizvesti slične teške učinke *in vivo*. Ako validirani i prihvaćeni *in vitro*/*ex vivo* testovi nisu dostupni, preskače se faza 6. i odmah se prelazi na fazu 7.

In vivo ispitivanje na kunićima (7. i 8. stupanj).

In vivo ispitivanje na očima treba započeti inicijalnim testom na jednoj životinji. Ako rezultati tog testa pokažu da kemikalija jako nadražuje ili nagriza oči, daljnja ispitivanja ne bi se smjela provoditi. Ako se tim testom ne utvrdi nikakvo nagrizajuće ili jako nadražujuće djelovanje, provodi se potvrdni test na dvije dodatne životinje. Ovisno o rezultatima potvrdnog testa, mogu biti potrebna dodatna ispitivanja. [vidjeti ispitnu metodu B.5.]

▼M7

STRATEGIJA ISPITIVANJA I OCJENJIVANJA NADRAŽUJUĆEG/NAGRIZAJUĆEG DJELOVANJA NA OČI

	Aktivnost	Nalaz	Zaključak
1.	Postojeći podaci dobiveni na ljudima i/ili životinjama i/ili *in vitro* podaci dobiveni validiranim i međunarodno prihvaćenim metodama o djelovanju na oči	Teško oštećenje očiju	Apikalna krajnja točka; tvar se smatra nagrizajućom za oči. Ispitivanje nije potrebno.
		Nadražujuća za oči	Apikalna krajnja točka; tvar se smatra nadražujućom za oči. Ispitivanje nije potrebno.
		Nije nagrizajuća / nije nadražujuća za oči	Apikalna krajnja točka; smatra se da tvar nije nagrizajuća i nadražujuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	Postojeći podaci dobiveni na ljudima i/ili životinjama i/ili *in vitro* podaci dobiveni validiranim i međunarodno prihvaćenim metodama o nagrizajućem djelovanju na kožu	Nagrizajuća za kožu	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	Postojeći podaci dobiveni na ljudima i/ili životinjama i/ili *in vitro* podaci dobiveni validiranim i međunarodno prihvaćenim metodama o jakom nadražujućem djelovanju na kožu	Jako nadražujuća za kožu	Pretpostavlja se da je tvar nadražujuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	↓		
	Nema raspoloživih informacija ili raspoložive informacije nisu pouzdane		
	↓		
2.	Provesti analizu SAR za procjenu nagrizajućeg/nadražujućeg djelovanja na oči	Predviđaju se teška oštećenja očiju	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
		Predviđa se nadraživanje očiju	Pretpostavlja se da je tvar nadražujuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	Razmisliti o analizi SAR za procjenu nagrizajućeg djelovanja na kožu	Predviđa se nagrizanje kože	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	↓		
	Djelovanje se ne može predvidjeti, ili predviđanja nisu uvjerljiva ili negativna		
	↓		
3.	Izmjeriti pH (puferski kapacitet, ako je relevantan)	pH ≤ 2 ili ≥ 11,5 (s visokim puferskim kapacitetom, ako je relevantan)	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća za oči. Ispitivanje nije potrebno.
	↓		
	2 < pH < 11,5 ili pH ≤ 2,0 ili ≥ 11,5 s malim ili nikakvim puferskim kapacitetom, ako je relevantan		
	↓		
4.	Razmotriti postojeće podatke o sustavnoj toksičnosti nakon dermalne izloženosti	Jako toksična pri koncentracijama koje bi se ispitivale na očima.	Kemikalija bi bila pretoksična za ispitivanje. Ispitivanje nije potrebno.

▼M7

	Aktivnost	Nalaz	Zaključak
	↓		
	Takve informacije nisu raspoložive ili kemikalija nije jako toksična		
	↓		
5.	Eksperimentalno procijeniti potencijal tvari da nagriza kožu u skladu sa strategijom ispitivanja iz poglavlja B.4. ovog Priloga ako se to zahtijeva i u regulatorne svrhe	Nagrizajući ili jako nadražujući učinak	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća za oči. Nije potrebno daljnje ispitivanje.
	↓		
	Kemikalija nije nagrizajuća ili jako nadražujuća za kožu		
	↓		
6.	Provesti jedan ili više validiranih i prihvaćenih *in vitro* ili *ex vivo* testova na očima	Nagrizajući ili jako nadražujući učinak	Pretpostavlja se da je tvar nagrizajuća ili jako nadražujuća za oči, pod uvjetom da se provedenim testom mogu identificirati nagrizajuće/jako nadražujuće tvari te da je predmetna kemikalija obuhvaćena područjem primjene tog testa. Nije potrebno daljnje ispitivanje.
		Nadražujući učinak	Pretpostavlja se da je tvar nadražujuća za oči, pod uvjetom da se provedenim testom (testovima) mogu ispravno identificirati nagrizajuće tvari, jako nadražujuće tvari i nadražujuće tvari te da je predmetna kemikalija obuhvaćena područjem primjene tog testa (tih testova). Nije potrebno daljnje ispitivanje.
		Nema nadražujućeg učinka	Pretpostavlja se da tvar nije nadražujuća za oči, pod uvjetom da se provedenim testom (testovima) mogu ispravno identificirati nenagrizajuće tvari te ispravno razlikovati od kemikalija koje djeluju nadražujuće, jako nadražujuće ili nagrizajuće za oči te da je predmetna kemikalija obuhvaćena područjem primjene tog testa. Nije potrebno daljnje ispitivanje.
	↓		
	Validirani i prihvaćeni in vitro ili ex vivo test(ovi) na očima ne mogu se upotrijebiti za donošenje zaključka		
	↓		

▼M7

	Aktivnost	Nalaz	Zaključak
7.	Provesti inicijalno *in vivo* ispitivanje na oku jednog kunića	Teško oštećenje očiju	Tvar se smatra nagrizajućom za oči. Nije potrebno daljnje ispitivanje.
	↓		
	Nema jakog oštećenja ili nema reakcije		
	↓		
8.	Provesti potvrdni test na jednoj ili dvije dodatne životinje	Nagrizajuća ili nadražujuća	Tvar se smatra nagrizajućom ili nadražujućom za oči Nije potrebno daljnje ispitivanje.
		Nije nagrizajuća ni nadražujuća	Smatra se da tvar nije nagrizajuća i nadražujuća za oči. Nije potrebno daljnje ispitivanje.

LITERATURA

OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Održana u Solni, Švedska, 22. – 24. siječnja 1996. (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, studeni 1998. (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161. – 177.

Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.

Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19. – 26.

Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, str. 483. – 524.

Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227. – 231.

Dodatak poglavlju B.4. ovog Priloga, Strategija sekvencijskog ispitivanja za nadraživanje i nagrizanje kože.

Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test transkutanog električnog otpora (TER).

10. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test na modelu ljudske kože.

11. OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

12. Poglavlje B.47. ovog Priloga, Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

13. Poglavlje B.48. ovog Priloga, Metoda ispitivanja na izoliranim očima pilića za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

▼B

B.6. **SENZIBILIZACIJA KOŽE**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Napomene:

Osjetljivost testova i njihova sposobnost otkrivanja mogućih senzibilizatora ljudske kože smatraju se važnima u sustavu klasifikacije toksičnosti relevantne za ljudsko zdravlje.

Ne postoji niti jedna ispitna metoda kojom se na primjeren način mogu utvrditi sve tvari koje mogu senzibilizirati ljudsku kožu i koja je relevantna za sve tvari.

Pri odabiru testa treba uzeti u obzir čimbenke kao što su fizikalna svojstva predmetne tvari, uključujući njezinu sposobnost prodiranja u kožu.

Razvijene su dvije vrste testova koji se provode na zamorcima: testovi u kojima se koristi adjuvans, kod kojih se alergijska reakcija pojačava otapanjem ili suspendiranjem ispitivane tvari u Freundovom potpunom adjuvansu (FCA) i testovi u kojima se adjuvans ne koristi.

U načelu su testovi kod kojih se upotrebljava adjuvans točniji u predviđanju vjerojatnog senzibilizacijskog učinka tvari na ljudsku kožu od onih kod kojih se Freundov potpuni adjuvans ne upotrebljava, pa su zato kao metoda primjereniji.

Maksimizacijski test sa zamorcima (GPMT) često je primjenjivani test s adjuvansom. Iako se može koristiti nekoliko drugih metoda za utvrđivanje potencijala tvari da prouzroči senzibilizacijsku reakciju kože, GPMT se smatra najprimjerenijom tehnikom u kojoj se koristi adjuvans.

Za mnoge se kemijske klase manje osjetljivima smatraju testovi u kojima se adjuvans ne koristi (preferira se Buehlerov test).

U određenim slučajevima mogu postojati utemeljeni razlozi za odabir Buehlerovog testa u kojem se ispitivana tvar primjenjuje lokalno, a ne intramedalnom injekcijom koja se koristi u maksimizacijskom testu sa zamorcima. U slučajevima kad se koristi Buehlerov test potrebno je dati znanstveno opravdanje.

Maksimizacijski test na zamorcima (GPMT) i Buehlerov test opisani su u ovoj metodi. Druge se metode mogu koristiti ako su ispravno validirane i znanstveno opravdane.

Ako se kod nekog priznatog testa probira utvrdi pozitivan rezultat, ispitivana se tvar može odrediti kao potencijalni senzibilizator pa nije potrebno provoditi daljnja ispitivanja na zamorcima. Međutim, ako se kod takvog testa utvrdi negativan rezultat, mora se provesti ispitivanje na zamorcima, uz primjenu postupka opisanog u ovoj ispitnoj metodi.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

▼B

1.2. DEFINICIJE

Senzibilizacija kože: (alergijski kontaktni dermatitis) imunološki posredovana kožna reakcija na određenu tvar. Kod ljudi reakciju može karakterizirati pruritis (svrbež), eritemi (crvenilo), edemi (otekline), papule (kožne izbočine), vezikule (mjehurići), bule (mjehuri) ili kombinacija navedenog. Kod drugih životinjskih vrsta reakcije se mogu razlikovati, te se mogu javiti samo eritemi i edemi.

Indukcijsko izlaganje: pokusno izlaganje subjekta ispitivanoj tvari s namjerom izazivanja stanja preosjetljivosti.

Indukcijsko razdoblje: razdoblje od najmanje jednog tjedna nakon indukcijske izloženosti tijekom kojega se može razviti stanje preosjetljivosti.

Provokacijsko izlaganje: pokusno izlaganje prethodno tretiranog subjekta ispitivanoj tvari nakon indukcijskog razdoblja, kako bi se utvrdilo javlja li se kod subjekta reakcija preosjetljivosti.

1.3. REFERENTNE TVARI:

Osjetljivost i pouzdanost pokusne tehnike koja se koristi treba ocjenjivati svakih šest mjeseci pomoću tvari za koje se zna da izazivaju blagu do srednju preosjetljivost kože.

Kod pravilno provedenog ispitivanja tvari koje izazivaju blagu do srednju preosjetljivost treba očekivati reakciju od najmanje 30 % u testu u kojem se adjuvans koristi i najmanje 15 % u testu u kojem se adjuvans ne koristi.

Prvenstveno se upotrebljavaju sljedeće tvari:

CAS brojevi	EINECS brojevi	EINECS nazivi	Uobičajeni nazivi
101-86-0	202-983-3	α-heksilcinamaldehid	α-heksilcinamaldehid
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptobenzotiazol)	kaptaks
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

U nekim se okolnostima, ako za to postoji primjereno opravdanje, mogu koristiti neke druge kontrolne tvari koje ispunjavaju gore navedeni kriterije.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Na početku se pokusne životinje izlažu ispitivanoj tvari intramedalnim injekcijama i/ili epidermalnim nanošenjem (indukcijsko izlaganje). Nakon razdoblja odmora od 10 do 14 dana (indukcijsko razdoblje), tijekom kojega se može razviti imuna reakcija, životinje se izlažu provokacijskoj dozi. Obim i stupanj kožne reakcije na provokacijsku izloženost kod pokusnih životinja uspoređuje se s reakcijama opaženim kod kontrolnih životinja koje se tijekom indukcije podvrgavaju simuliranom tretiranju i primaju provokacijsku dozu.

1.5. OPIS ISPITNIH METODA

Ako se uklanjanje ispitivane tvari smatra neophodnim, to treba učiniti vodom ili odgovarajućom otopinom, ne izazivajući promjene u postojećoj reakciji i ne narušavajući cjelovitost epiderme.

▼B

1.5.1. *Maksimizacijski test na zamorcima (GPMT)*

1.5.1.1. P r i p r e m a

Zdravi mladi odrasli albino zamorci prilagođavaju se laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana prije ispitivanja. Životinje se prije testa nasumce biraju i raspoređuju u skupine za tretiranje. Dlaka se odstranjuje šišanjem, brijanjem ili eventualno kemijskom depilacijom, ovisno o ispitnoj metodi koja se koristiti. Mora se paziti da se pritom ne ošteti površina kože. Životinje se važu prije nego ispitivanje započne i na kraju ispitivanja.

1.5.1.2. U v j e t i i s p i t i v a n j a

1.5.1.2.1. Pokusne životinje

Koriste se albino zamorci sojeva koji se obično koriste u laboratorijima.

1.5.1.2.2. Broj i spol

Mogu se koristiti mužjaci i/ili ženke. Ako se koriste ženke, treba koristiti one koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne.

Koristi se najmanje 10 životinja u skupini za tretiranje i najmanje pet životnija u kontrolnoj skupini. Ako se upotrijebi manje od 20 pokusnih i 10 kontrolnih zamoraca i pritom nije moguće zaključiti da ispitivana tvar spada u senzibilizatore, posebno se preporuča ispitivanje na dodatnim životinjama kako bi se dobio ukupan broj od najmanje 20 pokusnih i 10 kontrolnih životinja.

1.5.1.2.3. Visina doza

Koncentracija ispitivane tvari koja se koristi za svako indukcijsko izlaganje treba biti koncentracija koju životinja sustavno dobro podnosi i najviša koncentracija koja izaziva blagu do srednju nadraženost kože. Koncentracija koja se koristi za provokacijsko izlaganje treba odgovarati najvišoj dozi koja ne izaziva nadraženost. Odgovarajuće koncentracije treba utvrditi na temelju pilotske studije provedene na dvije ili tri životinje, ako nisu raspoložive druge informacije. Treba paziti da se za tu svrhu koriste životinje tretirane uz primjenu potpunog Freundovog adjuvansa (FCA).

1.5.1.3. P o s t u p a k

1.5.1.3.1. Indukcija

Dan 0 – tretirana skupina

U području ramena, s kojega je prethodno odstranjena dlaka, daju se tri para intradermalnih injekcija volumena 0,1 ml, po jedna injekcija iz svakog para sa svake strane zamišljene središnje linije.

Injekcija 1: mješavina 1:1 (v/v) FCA/voda ili fiziološka otopina.

Injekcija 2: ispitivana tvar u odabranoj koncentraciji u odgovarajućoj otopini.

Injekcija 3: ispitivana tvar u odabranoj koncentraciji, formulirana u mješavini 1:1 (v/v) FCA/voda ili fiziološka otopina.

U injekciji 3 tvari topljive u vodi otopljene su u vodenoj fazi prije miješanja s potpunim Freundovim adjuvansom (FCA). Tvari koje su topljive u mastima ili netopljive suspendiraju se u potpunom Freundovom adjuvansu (FCA) prije miješanja s vodenom fazom. Konačna koncentracija ispitivane tvari mora biti jednaka koncentraciji upotrijebljenoj u injekciji 2.

▼B

Injekcije 1 i 2 daju se blizu jedna drugoj i najbliže glavi, dok se injekcija 3 daje više prema kaudalnom (zadnjem) kraju ispitne površine.

Dan 0 – kontrolna skupina

Na ista područja kao i kod tretiranih životinja daju se po tri para intradermalnih injekcija volumena 0,1 ml.

Injekcija 1: mješavina 1:1 (v/v) FCA/voda ili fiziološka otopina.

Injekcija 2: nerazrijeđeni nosač.

Injekcija 3: 50 %-tna w/v formulacija nosača u mješavini 1:1 (v/v) FCA/voda ili fiziološka otopina.

Dan 5-7 – tretirana i kontrolna skupina

Oko 24 sata prije lokalne indukcijske primjene, ako tvar ne nadražuje kožu, ispitna se površina nakon šišanja uz kožu i/ili brijanja tretira s 0,5 ml 10 %-tne otopine natrijevog lauril sulfata u vazelinu, kako bi se izazvala lokalna nadraženost.

Dan 6-8 – tretirana skupina

S ispitne površine se ponovo odstranjuje dlaka. Filtarski papir (2 × 4 cm), potpuno se natopi ispitivanom tvari u odgovarajućem nosaču, stavi na ispitnu površinu i drži u kontaktu s kožom 48 sati pomoću okluzivnog obloga. Treba navesti razloge za odabir nosača. Krute se tvari usitne u fini prah i sjedine u odgovarajućem nosaču. Prema potrebi, tekućine se mogu nanositi nerazrijeđene.

Dan 6-8 – kontrolna skupina

S ispitne se površine ponovo odstranjuje dlaka. Na sličan se način na ispitnu površinu nanosi sami nosač i pomoću okluzivnog obloga drži u kontaktu s kožom 48 sati.

1.5.1.3.2. Provokacija

Dan 20-22 – tretirana i kontrolna skupina

Sa slabina tretiranih i kontrolnih životinja odstrani se dlaka. Krpica ili okluzivna komora (HTC) s ispitivanom tvari stavi se na jednu stranu slabina životinje i, ako je to relevantno za pokus, isto se tako može staviti jedna krpica ili okluzivna komora (HTC) koja sadrži samo nosač. Krpice se 24 sata drže u kontaktu s kožom pomoću okluzivnog obloga.

1.5.1.3.3. Opažanje i ocjenjivanje: tretirana i kontrolna skupina

— oko 21 sat nakon skidanja komprese provokacijska površina se opere i ošiša uz kožu i/ili obrije i, ako je potrebno, depilira,

— oko tri sata kasnije (oko 48 sati od početka provokacijske primjene) kožna se reakcija opaža i bilježi prema stupnjevima prikazanim u Dodatku,

— oko 24 sata nakon ovog opažanja provodi se drugo opažanje (72 sata), a rezultati se ponovo bilježe.

Preporuča se slijepa proba na pokusnim i kontrolnim životinjama.

Ako rezultate dobivene u prvoj provokaciji treba pojasniti, treba razmotriti mogućnost izvedbe druge provokacije (tj. ponovne provokacije) na novoj kontrolnoj skupini, tamo gdje je to primjereno, oko tjedan dana nakon prve provokacije. Ponovna provokacija može se jednako tako provesti na istoj kontrolnoj skupini.

▼B

Sve kožne reakcije i sve neuobičajene nalaze, uključujući sustavne reakcije, koji proizlaze iz indukcijskog i provokacijskog postupka treba opažati i bilježiti prema skali za stupnjevanje po Magnussonu/Kligmanu (vidjeti Dodatak). U svrhu pojašnjavanja dvojbenih rezultata mogu se provoditi i drugi postupci, npr. histopatološki pregled, mjerenje debljine kožnih nabora.

1.5.2. *Buehlerov test*

1.5.2.1. P r i p r e m a

Zdravi mladi odrasli albino zamorci prilagođavaju se laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana prije ispitivanja. Životinje se prije testa nasumce biraju i raspoređuju u skupine za tretiranje. Dlaka se odstranjuje šišanjem, brijanjem ili eventualno kemijskom depilacijom, ovisno o ispitnoj metodi koja će se koristiti. Mora se paziti da se pritom ne ošteti površina kože. Životinje se važu prije početka ispitivanja i na kraju ispitivanja.

1.5.2.2. U v j e t i i s p i t i v a n j a

1.5.2.2.1. Pokusne životinje

Koriste se albino zamorci sojeva koji se obično koriste u laboratorijima.

1.5.2.2.2. Broj i spol

Mogu se koristiti mužjaci i/ili ženke. Ako se koriste ženke, treba koristiti one koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne.

Koristi se najmanje 20 životinja u skupini za tretiranje i najmanje 10 životinja u kontrolnoj skupini.

1.5.2.2.3. Visina doza

Koncentracija ispitivane tvari koja se koristi za svako indukcijsko izlaganje treba biti najviša moguća koncentracija koja izaziva blagu, a ne pretjeranu nadraženost kože. Koncentracija koja se koristi za provokacijsko izlaganje treba odgovarati najvišoj dozi koja ne izaziva nadraženost. Ako je potrebno, odgovarajuće koncentracije mogu se utvrditi na temelju pilotske studije provedene na dvije ili tri životinje.

Kad se radi o tvarima topljivima u vodi, kao nosač je primjereno koristiti vodu ili razrijeđenu nenadražujuću otopinu surfaktanta. Za druge ispitivane tvari primjerenija je 80 %-tna mješavina etanola i vode za indukciju i aceton za provokaciju.

1.5.2.3. P o s t u p a k

1.5.2.3.1. Indukcija

Dan 0 – tretirana skupina

S jedne strane slabina odstrani se dlaka (šišanjem uz kožu). Ispitni epikutani sustav (patch sustav) treba biti potpuno natopljen ispitivanom tvari u odgovarajućem nosaču (za odabir nosača treba navesti razloge; tekuće ispitivane tvari mogu se prema potrebi primijeniti nerazrijeđene).

Ispitni epikutani sustav stavi se na ispitnu površinu i drži u kontaktu s kožom pomoću okluzivne krpice ili komore (HTC) i odgovarajućeg obloga šest sati.

▼B

Ispitni epikutani sustav mora biti okluzivan. Primjereno je upotrijebiti pamučnu blazinicu koja može biti okrugla ili četverokutna, približne površine 4-6 cm^2. Da bi se osigurala okluzija preporuča se životinju sputati pomoću odgovarajućeg pomagala za sputavanje. Ako se upotrijebi oblog možda će biti potrebna dodatna izlaganja.

Dan 0 – kontrolna skupina

S jedne strane slabina odstrani se dlaka (šišanjem uz kožu). Na ispitnu se površinu nanese sami nosač, na isti način koji se primjenjuje na tretiranu skupinu. Ispitni epikutani sustav drži se u kontaktu s kožom pomoću okluzivne krpice ili komore (HTC) i odgovarajućeg obloga šest sati. Ako se može dokazati da lažna kontrolna skupina nije potrebna, može se upotrijebiti netretirana kontrolna skupina.

Dan 6-8 i 13-15 – tretirana i kontrolna skupina

Na dan 6-8 i zatim ponovo na dan 13-15 ispitivana tvar se nanese jednako kao na dan 0 na isto područje (s kojeg se prema potrebi odstrani dlaka).

1.5.2.3.2. Provokacija

Dan 27-29 – tretirana i kontrolna skupina

S netretirane strane slabina tretiranih i netretiranih životinja odstrani se dlaka (šišanjem uz kožu). Okluzivna krpica ili komora (HTC) koja sadrži odgovarajuću količinu ispitivane tvari u maksimalnoj koncentraciji koja ne izaziva nadraženost stavi se na stražnji dio netretirane strane slabina tretiranih i kontrolnih životinja.

U slučajevima kad je to relevantno, okluzivna krpica ili komora (HTC) natopljena samo nosačem stavi se na prednji dio netretirane strane slabina kako tretiranih tako i kontrolnih životinja. Krpice ili komore (HTC) drže se u kontaktu s kožom pomoću odgovarajućeg obloga šest sati.

1.5.2.3.3. Opažanje i ocjenjivanje

— oko 21 sat nakon skidanja komprese s provokacijske se površine odstrani dlaka,

— oko tri sata kasnije (oko 30 sati nakon primjene krpice za provokaciju) kožne se reakcije opažaju i bilježe prema stupnjevima prikazanim u Dodatku,

— približno 24 sata nakon 30-satnog opažanja (oko 54 sata nakon stavljanja krpice za provokaciju) kožne se reakcije ponovo opažaju i bilježe.

Preporuča se slijepa proba na pokusnim i kontrolnim životinjama.

Ako je potrebno pojasniti rezultate dobivene u prvoj provokaciji, treba razmotriti mogućnost izvedbe druge provokacije (tj. ponovne provokacije) na novoj kontrolnoj skupini, tamo gdje je to primjereno, oko tjedan dana nakon prve provokacije. Ponovna provokacija može se provesti na istoj kontrolnoj skupini.

▼B

Sve kožne reakcije i sve neuobičajene nalaze, uključujući sustavne reakcije, koji proizlaze iz indukcijskog i provokacijskog postupka treba opažati i bilježiti prema skali za stupnjevanje po Magnussonu/Kligmanu (vidjeti Dodatak). U svrhu pojašnjavanja dvojbenih rezultata mogu se provoditi i drugi postupci, npr. histopatološki pregled, mjerenje debljine kožnih nabora.

2. **PODACI (GPMT i Buehlerov test)**

Podatke treba rezimirati u obliku tablice u kojoj će biti prikazane kožne reakcije za svaku životinju, zabilježene kod svakog opažanja.

3. **IZVJEŠĆIVANJE (GPMT i Buehlerov test)**

Ako se prije testa na zamorcima provede test probira, pored rezultata dobivenih s ispitivanom i referentnom tvari, mora se dati opis ili uputa na taj test (npr. test oticanja ušiju kod miševa (MEST) uključujući detaljne podatke o postupku.

Izvješće o ispitivanju (GPMT i Buehlerov test)

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati sljedeće informacije:

pokusne životinje:

— upotrijebljeni soj zamoraca,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku ispitivanja.

Uvjeti ispitivanja:

— tehnika pripremanja mjesta na koje će se staviti krpica,

— pojedinosti o upotrijebljenim materijalima i tehnici stavljanja krpice,

— rezultat pilotske studije sa zaključkom o indukcijskim i provokacijskim koncentracijama koje će se koristiti u ispitivanju,

— pojedinosti o pripremi, nanošenju i uklanjanju ispitivane tvari,

— obrazloženje za odabir nosača,

— koncentracije nosača i ispitivane tvari, korištene pri indukcijskom i provokacijskom izlaganju i ukupna količina tvari upotrijebljene za indukciju i provokaciju.

Rezultati:

— kratki pregled rezultata zadnje provjere osjetljivosti i pouzdanosti (vidjeti 1.3.) uključujući informacije o upotrijebljenoj tvari, koncentraciji i nosaču,

▼B

— za svaku životinju, uključujući sustav stupnjevanja,

— narativni opis vrste i stupnja opaženih učinaka,

— svi histopatološki nalazi.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 406.

▼B

Dodatak

TABLICA

Ljestvica stupnjevanja po Magnussonu/Klingmanu za ocjenjivanje reakcija kod provokacijskog epikutanog (patch) testa

0 = nema vidljive promjene

1 = lagani ili nepovezani (u obliku mrlja) eritem

2 = srednji ili konfluentni (povezan u jednu cjelinu) eritem

3 = jaki eritem i oteklina

▼M4

B.7. 28-DNEVNO ISPITIVANJE ORALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVACIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a 407 (2008.). Originalna Smjernica za ispitivanje 407 usvojena je 1981. 1995. usvojena je revidirana verzija kako bi se od životinja upotrijebljenih u ispitivanju dobile dodatne informacije, posebno o neurotoksičnosti i imunotoksičnosti.

2. 1998. godine OECD je započeo djelovanje visokog prioriteta radi revizije postojećih Smjernica za ispitivanje te radi razvoja novih Smjernica za preventivno ispitivanje i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (8). Jedan od elemenata aktivnosti bilo je ažuriranje postojeće smjernice OECD za „28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavacima uz primjenu ponavljanih doza" (TG 407) parametrima prikladnim za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Taj je postupak bio podvrgnut opsežnom međunarodnom programu za ispitivanje relevantnosti i provedivosti dodatnih parametara, održavanja tih parametara za kemikalije s (anti)estrogenom, (anti)androgenom i (anti)tiroidnom aktivnošću, intra- i interlaboratorijske mjerne obnovljivosti te utjecanja novih parametara na parametre koje zahtijeva prethodna smjernica TG 407. Velika količina podataka dobivenih na taj način prikupljena je i detaljno ocijenjena u opsežnom izvješću OECD-a (9). Ova ažurirana ispitna metoda B.7 (kao ekvivalent TG 407) rezultat je iskustva i rezultata dobivenih tijekom međunarodnog programa ispitivanja. Ova ispitna metoda omogućuje stavljanje određenih neizravnih endokrinih učinaka u kontekst s drugim toksikološkim učincima.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Pri određivanju i ocjenjivanju toksičnih svojstava kemikalije određivanje oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza može se provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz ispitivanja akutne toksičnosti. Ova ispitna metoda namijenjena je istraživanju učinaka na vrlo širok spektar potencijalnih meta toksičnosti. Pruža informacije o mogućnim rizicima po zdravlje za koje je vjerojatno da će nastati iz ponovljenog izlaganja tijekom relativno ograničenog vremenskog razdoblja, uključujući i učinke na živčani, imunološki i endokrini sustav. Što se tiče tih konkretnih konačnih učinaka, treba identificirati kemikalije s neurotoksičnim potencijalom koji može opravdati daljnja dublja istraživanja tog aspekta i kemikalija koje ometaju fiziologiju štitnjače. Također može pružiti podatke o kemikalijama koje pogađaju muške i/ili ženske reproduktivne organe u mladih odraslih životinja te može pružiti upozorenje na imunološke učinke.

4. Rezultate ove ispitne metode B.7 treba upotrijebiti za identifikaciju opasnosti i procjenu rizika. Rezultate dobivene parametrima povezanima s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „*OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*" (11). Ta metoda obuhvaća osnovno istraživanje toksičnosti s ponavljanim dozama koje se može upotrijebiti za kemikalije za koje nije opravdano 90-dnevno ispitivanje (npr. ako proizvedena količina ne prelazi određene granice) ili kao preliminarno ispitivanje za neko dugotrajno ispitivanje. Izlaganje mora trajati 28 dana.

▼M4

5. Provedeni međunarodni program za potvrdu parametara prikladnih za potencijalno otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivane kemikalije pokazao je da će kvaliteta podataka dobivenih ovom ispitnom metodom B.7 uvelike ovisiti o iskustvu ispitnog laboratorija. To se posebno dovodi u vezu s histopatološkim određivanjem cikličkih promjena u ženskim reproduktivnim organima te s određivanjem mase malih organa koji ovise o hormonima koji se teško seciraju. Razvijena je smjernica za histopatologiju (19). Ona je dostupna na OECD-ovoj javnoj stranici o Smjernicama za ispitivanje. Namijenjena je kao pomoć patolozima u njihovim pregledima i kao pomoć pri povećanju osjetljivosti analize. Pokazalo se da je čitav niz parametara indikativan za toksičnost povezanu s endokrinim sustavom te su oni uključeni u ovu ispitnu metodu. Parametri za koje nije bilo dovoljno dostupnih podataka koji bi dokazali korisnost ili koji su pružili samo slabe dokaze u programu potvrde njihove sposobnosti u pomaganju pri određivanju endokrinih ometača predloženi su kao opcijski konačni učinci (vidjeti Dodatak 2.).

6. Na temelju podataka dobivenih postupkom potvrde treba naglasiti da osjetljivost ove analize nije dovoljna za identifikaciju svih tvari s (anti)androgenim ili (anti)estrogenim načinima djelovanja (9). Ova ispitna metoda ne provodi se u životnom razdoblju koje je najosjetljivije na endokrine poremećaje. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tijekom postupka potvrde identificirala tvari koje slabo i snažno utječu na funkciju štitnjače te tvari snažne i umjerene endokrinološke aktivnosti, koje djeluju kroz estrogenske ili androgenske receptore, ali u većini slučajeva nije uspjela identificirati endokrinološki aktivne tvari koje slabo utječu na estrogenske ili androgenske receptore. Stoga se ne može opisati kao preventivna analiza za endokrinološku aktivnost.

7. Dakle, nedostatak učinaka povezanih s tim načinima djelovanja ne može se uzeti kao dokaz za nedostatak učinaka na endokrini sustav. Što se tiče neizravnih endokrinih učinaka, karakterizacija tvari se stoga ne treba temeljiti samo na rezultatima ove ispitne metode, nego je treba upotrijebiti u pristupu težine dokaza uz primjenu svih postojećih podataka o kemikaliji radi karakterizacije potencijalne endokrinološke aktivnosti. Stoga, regulatorna odluka o endokrinološkoj aktivnosti (karakterizacija tvari) mora biti utemeljena na širokom pristupu, a ne samo na rezultatima primjene ove ispitne metode.

8. Potvrđeno je da će svi postupci utemeljeni na životinjama potvrditi lokalne standarde brige o životinjama; opisi brige i tretmana navedeni u nastavku jesu minimalni standardi postupanja i zamijenit će ih lokalna regulativa u slučajevima gdje je stroža. Ostale smjernice za humano tretiranje životinja dao je OECD (14).

9. Korištene definicije nalaze se u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Ispitivana se kemikalija 28 dana svakodnevno oralno primjenjuje u stupnjevanim dozama za nekoliko skupina pokusnih životinja, po jedna visina doze na svaku skupinu. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu usmrćene tijekom ispitivanja obavlja se obdukcija, s tim da se po završetku ispitivanja preživjele životinje usmrćuju i također obduciraju. 28-dnevno ispitivanje pruža informacije o učincima

▼M4

ponovljenog oralnog izlaganja i može ukazati na potrebu za daljnjim dugotrajnim ispitivanjima. Također, može pružiti informacije o odabiru koncentracija za dugotrajna ispitivanja. Podaci dobiveni primjenom ove ispitne metode moraju omogućiti karakterizaciju toksičnosti ispitivane kemikalije, ukazivanje na odnos doze i reakcije te određivanje vrijednosti visine doze bez vidljivih štetnih učinaka (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level).

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

11. Najčešće korištena životinjska vrsta je štakor iako se mogu koristiti i neke druge vrste glodavaca. Ako se parametri navedeni u ovoj ispitnoj metodi B.7 istražuju na drugoj vrsti glodavaca, treba pružiti detaljno obrazloženje. Iako je biološki logično da druge vrste moraju na sličan način kao i štakor reagirati na toksične tvari, primjena manjih vrsta može rezultirati povećanom raznolikošću zbog tehničkih izazova pri seciranju manjih organa. U programu međunarodne potvrde za određivanje endokrinih ometača primjenjivali su se samo štakori. Treba upotrijebiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji su uobičajeni u laboratorijskoj praksi. Odabiru se ženke koje prethodno nisu imale leglo i koje nisu gravidne. S doziranjem treba početi što je prije moguće nakon odbijanja mladunaca od sise, a u svakom slučaju prije nego što životinje navrše devet tjedana. Na početku ispitivanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja smiju biti minimalne i ne premašivati ± 20 % prosječne tjelesne mase svakog spola. Kada se ponovljena oralna doza upotrebljava kao preliminarna u odnosu na dugotrajno istraživanje, prednost se daje primjeni životinja istog soja i istog podrijetla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

12. Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriju. Temperatura u prostoriji s pokusnim životinjama trebala bi iznositi 22 °C (± 3 °C). Premda bi relativna vlažnost zraka trebala iznositi najmanje 30 % te po mogućnosti ne premašivati 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50 - 60 %. Rasvjeta treba biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može primjenjivati konvencionalna laboratorijska prehrana uz neograničene količine pitke vode. Na odabir prehrane može utjecati potreba za osiguranjem prikladne primjese ispitivane kemikalije ako se ista primjenjuje tom metodom. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; životinje se mogu smjestiti i pojedinačno ako je to znanstveno opravdano. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja.

13. Hranu treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari. Uzorak prehrane treba zadržati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

14. Zdrave, mlade odrasle životinje nasumično se raspoređuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se identificiraju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi im se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uvjete.

Priprema doza

15. Ispitivana se kemikalija primjenjuje oralnom intubacijom pomoću želučane sonde, odnosno preko hrane ili vode za piće. Metoda oralne primjene ovisi o svrsi studije i fizikalnim/kemijskim/toksikokinetičkim svojstvima ispitivane kemikalije.

▼M4

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

POSTUPAK

Broj i spol životinja

17. Najmanje deset životinja (pet ženki i pet mužjaka) treba upotrijebiti za ispitivanje svake visine doze. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, prije završetka studije navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđen za takvo usmrćivanje. Treba razmotriti i mogućnost uključivanja i dodatne satelitske skupine od deset životinja (pet od svakoga spola) u kontrolnu skupinu i skupinu koja će primiti najvišu dozu radi opažanja reverzibilnosti, postojanosti ili zakašnjelog nastupa toksičnih učinaka najmanje 14 dana nakon tretiranja.

Doziranje

18. Općenito gledano, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i kontrolnu skupinu, ali ako se iz procjene drugih podataka ne očekuju učinci kod doze od 1 000 mg/kg tjelesne mase po danu, može se provesti granični test. Ako nisu dostupni prikladni podaci, može se provesti preliminarno ispitivanje za određivanje raspona (životinje istog soja i podrijetla) kako bi se pomoglo pri određivanju visina doze koje će se primjenjivati. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na jednak način kao i sa životinjama u ispitnoj skupini. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.

19. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni za ispitivanu kemikaliju ili srodne kemikalije. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem da se izazovu toksični učinci, ali ne i smrt ili velika patnja životinja. Nakon toga treba odabrati niz sve nižih doza koje će se primjenjivati za utvrđivanje svih reakcija vezanih uz doziranje, kao i dozu kod koje nema vidljivih štetnih učinaka (NOAEL) kao najnižu dozu. Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu pokusnu skupinu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 10).

20. U slučaju prisutnosti opažene opće toksičnosti (npr. smanjene tjelesne mase, učinaka na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili drugih promjena koje ne moraju biti reakcija na toksičnost (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), opažene učinke na imunološkim, neurološkim ili endokrinim krajnjim učincima treba tumačiti s oprezom.

Granični test

21. Ako test s jednom visinom doze, koja iznosi najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan, ili je zbog davanja hrane ili pitke vode jednaka postotku u hrani ili pitkoj vodi (na temelju određivanja tjelesne mase), uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne izazove vidljive štetne učinke i ako se toksičnost ne očekuje na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima, potpuna studija uz primjenu tri visine doza neće se smatrati neophodnom. Granični test ne vrijedi samo u slučajevima kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom više doze.

▼M4

Primjena doza

22. Životinjama se ispitivana kemikalija dozira svakodnevno 7 dana u tjednu u razdoblju od 28 dana. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba dati u jednoj dozi pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina gdje je dopušteno upotrijebiti 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

23. Kod kemikalija koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje u hrani, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; alternativa koja se koristi u pokusu mora se specificirati. U slučajevima kad se kemikalija daje oralnom intubacijom, dozu treba davati svaki dan otprilike u isto vrijeme te je po potrebi prilagođavati kako bi se održala stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kad se prije dugotrajnog ispitivanja radi preliminarna studija s ponovljenim dozama, u obje studije prehrana životinja treba biti slična.

Opažanja

24. Opažanje bi trebalo trajati 28 dana. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje treba najmanje 14 dana držati bez tretiranja kako bi se utvrdilo jesu li toksični učinci zakašnjeli ili postojani i jesu li se životinje od njih oporavile.

25. Opća bi klinička opažanja trebalo obavljati barem jednom dnevno, najbolje u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja. Zdravstveno stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i mortaliteta.

26. Jednom prije prvog izlaganja, te barem jednom tjedno nakon toga, treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih životinja (ovo će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom ograđenom prostoru i svaki put otprilike u isto vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti sustav vrednovanja jasno definiran od strane laboratorija koji obavlja ispitivanje. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima ispitivanja budu minimalna te da opažanja po mogućnosti provode promatrači koji ne znaju za tretiranje. Opaženi simptomi trebaju obuhvaćati, ali ne biti ograničeni na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu sekreta i ekskreta te aktivnost autonomnog živčanog sustava (npr. lakrimacija (suzenje), piloerekcija (naježenost dlake), veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug) ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (2).

27. U četvrtom tjednu izlaganja treba obaviti ocjenu senzorne reaktivnosti na različite podražaje (2) (npr. zvučne, vizualne i proprioceptivne) (3)(4)(5), ocjenu jakosti stiska (6) te ocjenu motoričke aktivnosti (7). Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, osim referentnih mogu se primjenjivati i alternativni postupci.

▼M4

28. Funkcionalna opažanja koja se obavljaju u četvrtom tjednu izlaganja mogu se izostaviti ako se studija provodi kao preliminarno ispitvanje za naknadnu (90-dnevnu) studiju subkroničnosti. U tom slučaju funkcionalna opažanja treba uključiti u tu sljedeću studiju. S druge strane, kad postoje podaci o funkcionalnim opažanjima iz studije uz primjenu ponavljanih doza, može se povećati mogućnost odabira visina doza za naknadnu studiju subkroničnosti.

29. U iznimnim slučajevima funkcionalna opažanja mogu izostati i kod skupina koje na drugi način pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

30. Pri obdukciji treba uzimanjem vaginalnih razmaza (opcijski) odrediti cikluse estrusa svih ženki. Ta će opažanja pružiti informacije o stadiju ciklusa estrusa u vrijeme usmrćivanja te pomoći pri histološkoj ocjeni tkiva osjetljivih na estrogen [vidjeti smjernicu o histopatologiji (19)].

Tjelesna masa i unos hrane/vode

31. Sve životinje treba vagati barem jednom tjedno. Unos hrane treba mjeriti najmanje na tjednoj osnovi. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, unos vode treba isto tako mjeriti najmanje na tjednoj osnovi.

Hematologija

32. Na kraju razdoblja ispitivanja treba obaviti sljedeće hematološke pretrage: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, retikulocite, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi. Ostala određivanja koja treba provesti ako ispitivana kemikalija ili njezini navodni metaboliti imaju ili se sumnja da imaju oksidacijska svojstva obuhvaćaju koncentraciju metaemoglobina i Heinzova tjelešca.

33. Uzorke krvi je potrebno uzeti na specificiranom mjestu i pohraniti u odgovarajućim uvjetima neposredno prije ili u tijeku usmrćivanja životinja. Životinje trebaju postiti tijekom noći prije usmrćivanja ([1]).

Klinička biokemija

34. Kliničke biokemijske pretrage za utvrđivanje jakog toksičnog djelovanja na tkiva i posebno na bubrege i jetru, treba obaviti na uzorcima krvi uzetim od svake životinje neposredno prije usmrćivanja ili u okviru postupka usmrćivanja životinja (osim u uvjetima za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su neplanirano usmrćene prije završetka studije). Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebaju obuhvatiti mjerenje natrija, kalija, glukoze, ukupne količine kolesterola, ureje, kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te više od dva enzima indikativna za hepatocelularna oštećenja (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama glutamil transpeptidaza i glutamat dehidrogenaza) te žučne kiseline. Mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog podrijetla) i bilirubina mogu u određenim okolnostima pružiti korisne informacije.

35. U zadnjem tjednu studije neobvezno se mogu obaviti analize urina dobivenog sabiranjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne stanice.

([1]) Post tijekom noći preporuča se za niz mjerenja u serumu i plazmi, a najviše za glukozu. Najvažniji razlog za tu preporuku jest činjenica da bi povećana varijabilnost, koja bi neizbježno nastala kao rezultat izostanka posta, pokazivala sklonost zamagljivanju suptilnih učinaka i otežala tumačenje rezultata. S druge pak strane post preko noći može utjecati na opći metabolizam životinja, a posebno u studijama o hranjenju moglo bi ometati dnevno izlaganje ispitivanoj kemikaliji. Ako se primjenjuje post preko noći, klinička biokemijska određivanja treba obaviti nakon provođenja funkcionalnih opažanja u 4. tjednu studije.

▼M4

36. Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju plazmatskih ili serumskih markera koji označavaju oštećenja tkiva. Ako poznata svojstva ispitivane kemikalije mogu, ili se očekuje da će, utjecati na određene metaboličke profile, treba obaviti i druge pretrage koje uključuju kalcij, fosfor, trigliceride, specifične hormone i kolinesterazu. Te vrijednosti treba izmjeriti kod izloženosti kemikalijama određenih klasa opasnosti ili od slučaja do slučaja.

37. Iako u međunarodnoj procjeni krajnjih učinaka povezanih s endokrinim sustavom nije dokazana jasna prednost za određivanje hormona štitnjače (T3, T4) i TSH, može biti korisno zadržati uzorke plazme ili seruma radi mjerenja T3, T4 i TSH (opcijski) ako postoji indikacija za djelovanje na osovinu hipofiza-štitna žlijezda. Ti se uzorci mogu zamrznuti na -20° radi skladištenja. Sljedeći čimbenici mogu utjecati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:

— vrijeme usmrćivanja zbog varijacije koncentracije hormona kroz dan

— metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona

— pribor za određivanje hormona koji se može razlikovati od njihovih standardnih krivulja.

Konačna identifikacija kemikalija koje djeluju na štitnjaču pouzdanija je pomoću histopatološke analize nego pomoću razine hormona.

38. Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u usporedivo doba dana. Preporuča se da se obrati pozornost na određivanje T3, T4 i TSH potaknuto na temelju promjena u histopatologiji štitnjače. Brojčane vrijednosti dobivene analizom koncentracija hormona razlikuju se ovisno o različitom, komercijalno dostupnom priboru. Stoga se može dogoditi da nije moguće pružiti kriterije o djelovanju na temelju ujednačenih povijesnih podataka. Druga je mogućnost da laboratoriji nastoje održavati koeficijente varijacije ispod 25 za T3 i T4 te ispod 35 za TSH. Sve koncentracije treba zabilježiti u mg/ml.

39. Ako su povijesni polazni podaci neprikladni, u obzir valja uzeti određivanje hematoloških i kliničkih biokemijskih varijabli prije početka doziranja ili po mogućnosti na skupini životinja koje nisu uključene u pokusne skupine.

PATOLOGIJA

Makroskopska analiza

40. Sve životinje korištene u studiji moraju se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj analizi koja obuhvaća pažljivi pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. S jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, testisa, epididimisa, prostate + sjemenskih mjehurića s koagulacijskim žlijezdama kao cjeline, timusa, slezene, mozga i srca svih životinja (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili se neplanirano usmrte prije završetka studije) treba obrezati sve okolno tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon sekcije kako bi se izbjeglo sušenje organa. Treba biti pažljiv pri obrezivanju kompleksa prostate da se izbjegne punkcija sjemenskih mjehurića ispunjenih tekućinom. Druga je mogućnost da se sjemenski mjehurići i prostata obrežu i izvažu nakon fiksacije.

▼M4

41. Osim toga, još dva tkiva mogu se opcijski izvagati što prije nakon sekcije kako bi se izbjeglo njihovo sušenje: jajnici u paru (mokra težina) i maternica, uključujući i grlić maternice (upute za uklanjanje i pripremu maternič nih tkiva radi vaganja dane su u OECD TG 440 (18)).

42. Masa štitnjače (opcijski) može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećivanje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu.

43. Sljedeća tkiva treba čuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za tu vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled (vidjeti stavak 47): sve velike lezije, mozak (reprezentativne regije uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu, oko, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, bubrege, nadbubdrežne žlijezde, slezenu, srce, timus, štitnjaču, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), spolne žlijezde (testise i jajnike), pomoćne spolne organe (maternicu i cerviks, epididimise, prostatu + sjemenske mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama), vaginu, mokraćni mjehur, limfne čvorove [osim najbližeg drenažnog čvora treba uzeti još jedan limfni čvor na temelju laboratorijskog iskustva (15)], periferni živac (bedreni ili tibijalni) po mogućnosti smješten uz mišić, skeletni mišić i kost, s leđnom moždinom (sekcija ili alternativno svježi aspirat koštane srži). Preporuča se da se testisi fiksiraju uranjanjem u Bouinov ili izmijenjeni Davidsonov fiksativ (16) (17). Vezivnu ovojnicu treba nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa. Klinički i drugi nalazi mogu sugerirati potrebu za pregledom dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve one organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni.

44. Sljedeća tkiva mogu dati dragocjenu indikaciju za učinke na endokrini sustav: Spolne žlijezde (jajnici i testisi), pomoćni spolni organi (maternica s cerviksom, epididimisi, sjemenski mjehurići s koagulacijskim žlijezdama, dorzolateralna i ventralna prostata), vagina, hipofiza, muška mliječna žlijezda, štitnjača i nadbubrežna žlijezda. Promjene u muškim mliječnim žlijezdama nisu dovoljno dokumentirane, ali taj parametar može biti vrlo osjetljiv na tvari s estrogenskim djelovanjem. Opažanja organa/tkiva koja nisu nisu popisana u stavku 43. su opcijska (vidjeti Dodatak 2.).

45. Smjernica o histopatologiji (19) pruža dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

46. U međunarodnom programu ispitivanja dobiveni su neki dokazi da se suptilni učinci na endokrini sustav uzrokovani kemikalijama male snage utjecaja na homeostazu spolnih hormona mogu identificirati pomoću smetnje u sinkronizaciji ciklusa estrusa u različitim tkivima, a ne toliko očitim histopatološkim promjenama na ženskim spolnim organima. Iako nije dobiven konačan dokaz za takve učinke, preporuča se da se pri tumačenju histopatologije jajnika (folikularnih, tekalnih i granuloznih stanica), maternice, cerviksa i vagine u obzir uzmu dokazi moguće asinkronije ciklusa estrusa. Ako se tako procijeni, u tu usporedbu može se također uključiti i stadij ciklusa određen vaginalnim razmazima.

▼M4

Histopatologija

47. Na sačuvanim organima i tkivima svih životinja u kontrolnoj skupini i skupini s visokom dozom treba provesti potpunu histopatologiju. Ta ispitivanja treba proširiti na životinje svih drugih skupina doziranja ako su u skupini s visokom dozom opažene promjene povezane s tretiranjem.

48. Treba pregledati sve veće lezije.

49. Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled onih tkiva i organa na kojima su kod tretiranih skupina primijećene promjene.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

50. Podatke treba prikazati pojedinačno za svaku životinju. Osim toga, najbolje ih je rezimirati u obliku tablice iz koje se za svaku testiranu skupinu vidjeti broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje uginule ili su iz humanih razloga usmrćene tijekom ispitivanja, vrijeme smrti ili humanog usmrćivanja, broj životinja kod kojih su opaženi znakovi toksičnosti, opis opaženih znakova toksičnosti, uključujući i vrijeme pojavljivanja, trajanje i stupanj svih toksičkih učinaka, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i postotak životinja koje pokazuju određene vrste lezija.

51. Tamo gdje je to moguće, brojčane rezultate treba analizirati uz primjenu odgovarajuće opće prihvatljive statističke metode. Usporedbe učinaka po rasponu visina doza trebala bi spriječiti uporabu višestrukih t-ispitivanja. Statističke metode treba odabrati još u fazi planiranja studije.

52. Radi kontrole kvalitete predlaže se da se skupljaju povijesni kontrolni podaci te da se izračunaju koeficijenti varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kada se ocjenjuju stvarne studije.

Izvješće o ispitivanju

53. Izvješću o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalna narav, čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci.

Nosač (po potrebi):

— dokaz opravdanosti odabira nosača, ako se ne radi o vodi.

Pokusne životinje:

— korištena vrsta/soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— pojedinačne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja.

— obrazloženje odabira vrste, ako se ne radi o štakorima.

Uvjeti ispitivanja:

— obrazloženje za odabir visina doza,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravaka,

▼M4

— podaci o primjeni ispitivane kemikalije,

— preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Opcijski istraživani krajnji učinci

— popis istraživanih opcijskih krajnjih učinaka.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene u tjelesnoj masi,

— unos hrane i unos vode, po potrebi,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i visini doza, uključujući znakove toksičnosti,

— vrsta, stupanj i trajanje opaženih kliničkih promjena (jesu li reverzibilne ili nisu),

— senzorska aktivnost, ocjena jakosti stiska i motorne aktivnosti,

— hematološka ispitivanja s relevantnim normalnim vrijednostima,

— klinička biokemijska ispitivanja s relevantnim normalnim vrijednostima,

— podaci o tjelesnoj masi nakon smrti i podaci o masi organa,

— nalazi obdukcije,

— detaljni opis svih histopatoloških nalaza,

— podaci o apsorpciji, ako postoje,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

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

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

Antitiroidna aktivnost jest sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T_3) u organizmu sisavaca.

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

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

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

NOAEL je kratica za veličinu doze bez vidljivih štetnih učinaka. To je najviša doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci vezani uz tretiranje.

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

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

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

Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode, za pokazivanje njezine pouzdanosti i relevantnosti za dotičnu svrhu.

▼M4

Dodatak 2.

Krajnji učinci preporučeni za detekciju endokrinih ometača (ED-ova) u ovoj ispitnoj metodi B.7

Obvezni krajnji učinci	Opcijski krajnji učinci
Masa	
— testisi	— jajnici
— epididimisi	— maternica s cerviksom
— nadbubrežne žlijezde	— štitnjača
— prostata + sjemenski mjehurići s koagulacijskim žlijezdama	
Histopatologija	
— spolne žlijezde:	— vaginalni razmazi
— testisi i	— muške mliječne žlijezde
— jajnici	— hipofiza
— pomoćni spolni organi:	
— epididimisi	
— prostata + sjemenski mjehurići s koagulacijskim žlijezdama	
— maternica s cerviksom	
— nadbubrežna žlijezda	
— štitnjača	
— vagina	
Mjerenje hormona	
	— razine cirkulirajućih hormona T3, T4
	— razine cirkulirajućeg hormona TSH

LITERATURA

1. OECD (Pariz, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

3. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

4. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

5. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

6. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

7. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

8. OECD (1998.). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9. OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10. OECD (2002.). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11. OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12. OECD (2006.). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13. OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14. OECD (2000.). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15. Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

16. Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

17. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

18. OECD (2007.). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19. OECD (2009.). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **SUBAKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST: 28-DNEVNA STUDIJA**

SAŽETAK

Ova revidirana ispitna metoda B.8 osmišljena je za potpunu karakterizaciju toksičnosti ispitivane kemikalije inhalacijom pomoću ponovljenog izlaganja u ograničenom vremenskom razdoblju (28 dana) te za pružanje podataka za procjenu kvantitativnog rizika od inhalacije. Skupine od najmanje pet mužjaka i pet ženki glodavaca izlažu se šest sati dnevno 28 dana a) ispitivanoj kemikaliji na tri ili više razina koncentracije, b) filtriranom zraku (negativna kontrola) i/ili c) nosaču (kontrola nosača). Životinje se općenito izlažu pet dana tjedno, ali također je dopušteno i izlaganje sedam dana tjedno. Uvijek se ispituju mužjaci i ženke, ali se oni mogu izlagati različitim razinama koncentracije ako je poznato da je jedan od spolova osjetljiviji na ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje. Ova metoda voditelju istraživanja omogućuje fleksibilnost uključivanja satelitskih (reverzibilnih) skupina, bronhoalveolarnog ispiranja (BAL), neuroloških ispitivanja te dodatnih kliničko-patoloških i histopatoloških procjena s ciljem bolje karakterizacije toksičnosti ispitivane kemikalije.

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a 412 (2009.). Originalna Smjernica za ispitivanje 412 (TG 412) o subakutnoj inhalaciji usvojena je 1981. (1). Ova ispitna metoda B.8 (kao ekvivalent revidiranoj TG 412) ažurirana je kako bi odrazila stanje znanosti te kako bi ispunila aktualne i buduće regulatorne potrebe.

2. Ova metoda omogućuje karakterizaciju štetnih učinaka nakon ponovljenog svakodnevnog inhalacijskog izlaganja ispitivanoj kemikaliji 28 dana. Podaci dobiveni 28-dnevnom studijom subakutne inhalacijske toksičnosti mogu se upotrijebiti za procjene kvantitativnog rizika [ako ne slijedi 90-dnevna studija subkronične inhalacijske toksičnosti (Poglavlje B.29 ovog Priloga)]. Podaci također mogu pružiti informacije o odabiru koncentracija za dugotrajne studije, kao što je 90-dnevna studija subkronične inhalacijske toksičnosti. Ova ispitna metoda nije specijalno namijenjena testiranju nanomaterijala. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog Poglavlja i u Smjernici 39. (2).

UVODNA RAZMATRANJA

3. Laboratorij koji provodi ispitivanje mora prije provođenja studije u obzir uzeti sve raspoložive informacije o ispitivanoj kemikaliji kako bi povećao kvalitetu studije i na minimum sveo primjenu životinja. Informacije koje će pomoći u odabiru najprikladnijih ispitnih koncentracija mogu obuhvaćati identitet, kemijsku strukturu te fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije, rezultate bilo kakvih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo*, očekivanu(-e) uporabu(-e) i potencijal za izlaganje ljudi, dostupne podatke o (Q)SAR i toksikološke podatke o kemikalijama srodne strukture te podatke dobivene ispitivanjem akutne inhalacijske toksičnosti. Ako se tijekom studije očekuje ili uoči neurotoksičnost, voditelj istraživanja može odlučiti da obuhvati prikladne procjene kao što su serije funkcionalnih opažanja (FOB) te mjerenje motoričke aktivnosti. Iako određivanje vremena izlaganja u svezi sa specifičnim ispitivanjima može biti ključno, obavljanje tih dodatnih aktivnosti ne bi trebalo utjecati na osnovni plan studije.

▼M4

4. Razrijeđene nagrizajuće ili nadražujuće ispitivane kemikalije mogu se ispitivati na koncentracijama koje će proizvesti željeni stupanj toksičnosti [vidjeti GD 39 (2)]. Kada se životinje izlažu tim materijalima, ciljane koncentracije moraju biti dovoljno niske da ne bi izazvale značajnu patnju ili stres, ali biti dovoljno visoke za proširenje krivulje koncentracije i reakcije na razine koje ispunjavaju regulatorni i znanstveni cilj ispitivanja. Te koncentracije treba odabirati u svakom pojedinom slučaju, najbolje na temelju odgovarajuće isplanirane studije za utvrđivanje raspona koja pruža informacije o kritičnim krajnjim učincima, pragu nadraženosti te vremenu pojavljivanja (vidjeti stavke 11. - 13.). Treba pružiti obrazloženje za odabir koncentracija.

5. Životinje u stanju ugibanja ili životinje koje očito trpe bol ili pokazuju znakove ozbiljnog stresa treba humano usmrtiti. Životinje u stanju ugibanja uzimaju se u obzir jednako kao i životinje koje uginu pri ispitivanju. Kriteriji za odlučivanje o usmrćivanju životinja u stanju ugibanja ili koje teško pate te upute o prepoznavanju predvidive ili prijeteće smrti predmet su Smjernice za humano usmrćivanje br. 19 OECD-a (3).

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

6. Treba upotrijebiti zdrave, mlade odrasle glodavce sojeva koji se obično koriste u laboratorijima. Prednost se daje vrsti štakora. U slučaju primjene drugih vrsta treba priložiti obrazloženje.

Priprema životinja

7. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na dan nasumičnog odabira životinje moraju biti mlade odrasle jedinke u dobi između 7 i 9 tjedana. Tjelesna masa mora biti u rasponu ± 20 % prosječne mase svakog spola. Životinje se nasumično odabiru, označavaju radi pojedinačne identifikacije te drže u kavezima najmanje pet dana prije početka ispitivanja kako bi im se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uvjete.

Uzgoj životinja

8. Životinje treba pojedinačno identificirati, po mogućnosti potkožnim transponderima, kako bi se olakšalo opažanje i izbjegla zamjena. Temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi iznositi 22 ± 3 °C. Relativna vlažnost zraka idealno bi se morala održavati u rasponu od 30 do 70 % iako to možda neće biti moguće kad se kao nosač primjenjuje voda. Prije i nakon izlaganja životinje općenito treba smjestiti u kaveze u skupinama po spolu i koncentraciji, ali broj životinja po kavezu ne smije ometati jasna opažanja svake životinje i tako se trebaju na minimum svesti gubici zbog kanibalizma i borbe. Ako izlaže samo nos životinja, može biti potrebno aklimatizirati životinje na cijevi koje ih sputavaju. Cijevi koje sputavaju životinje ne smiju im nametnuti pretjeran fizički, toplinski ili imobilizacijski stres. Sputavanje može utjecati na fiziološke krajnje učinke, poput tjelesne temperature (hipertermija) i/ili respiratornog minutnog volumena. Ako su dostupni generički podaci koji pokazuju da se takve promjene ne događaju u znatnom opsegu, nije potrebna prethodna prilagodba cijevima koje sputavaju. Životinje, koje su cijelim tijelom izložene aerosolu, tijekom izlaganja treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječilo da se ispitivani aerosol filtrira kroz krzno drugih životinja u istom kavezu. Može se upotrijebiti konvencionalna i certificirana laboratorijska prehrana, osim tijekom izlaganja, u kombinaciji s neograničenom zalihom javne pitke vode. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka.

▼M4

Komore za inhalaciju

9. Pri odabiru komore za inhalaciju u obzir valja uzeti narav ispitivane kemikalije i predmet ispitivanja. Prednost se daje metodi izlaganja samo nosom (koja uključuje samo glavu, samo nos ili samo njušku). Izlaganju samo nosom općenito se daje prednost za ispitivanja tekućih ili krutih aerosola te para koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Posebni ciljevi ispitivanja mogu se bolje postići uporabom izlaganja čitavog tijela, ali to treba opravdati u izvješću o ispitivanju. Kako bi se osigurala stabilnost atmosfere u slučaju primjene komore za čitavo tijelo, ukupni volumen pokusnih životinja ne smije premašiti 5 % volumena komore. Načela tehnika izlaganja samo nosom i čitavim tijelom te njihove specifične prednosti i nedostaci opisani su u GD 39 (2).

STUDIJE TOKSIČNOSTI

Granične koncentracije

10. Za razliku od akutnih studija, u 28-dnevnoj studiji subakutne inhalacijske toksičnosti nema određenih graničnih koncentracija. Maksimalna ispitna koncentracija treba uzeti u obzir: 1) maksimalnu koncentraciju koja se može postići, 2) razinu za izlaganje ljudi s „najgorim scenarijem ”, 3) potrebu za održavanjem odgovarajuće opskrbe kisikom i/ili 4) pretpostavke za dobrobit životinja. U nedostatku ograničenja na temelju podataka mogu se upotrijebiti akutne granice iz Uredbe (EZ) br. 1272/2008 (13) (tj. do maksimalne koncentracije od 5 mg/l za aerosole, 20 mg/l za pare i 20 000 ppm za plinove); vidjeti GD 39 (2). Ako je pri ispitivanju plinova ili vrlo hlapljivih ispitivanih kemikalija (npr. rashladnih sredstava) potrebno premašiti te granice, treba priložiti obrazloženje. Granična koncentracija trebala bi izazvati nedvojbenu toksičnost, a da pritom ne izazove pretjerani stres za životinje ili utječe na njihovu dugovječnost (3).

Studija za utvrđivanje raspona

11. Prije početka glavne studije može biti potrebno provesti studiju za utvrđivanje raspona. Studija za utvrđivanje raspona opsežnija je od preliminarne studije jer nije ograničena na odabir koncentracije. Znanje prikupljeno u studiji za utvrđivanje raspona može dovesti do uspješne glavne studije. Studija za utvrđivanje raspona može, primjerice, pružiti tehničke informacije u svezi s analitičkim metodama, određivanjem veličine čestica, otkrivanjem toksičnih mehanizama, kliničko-patološkim i histopatološkim podacima i procjenama mogućih NOAEL i MTC koncentracija u glavnoj studiji. Voditelj istraživanja može odlučiti primijeniti studiju za utvrđivanje raspona radi identifikacije praga nadraženosti respiratornog trakta (npr. s histopatologijom respiratornog trakta, ispitivanjem plućnih funkcija ili bronhoalveolarnim ispiranjem), gornje koncentracije koja se tolerira bez prekomjernog stresa za životinje i parametara koji će najbolje okarakterizirati toksičnost ispitivane kemikalije.

12. Studija za utvrđivanje raspona može obuhvaćati jednu ili više razina koncentracije. Svakoj razini koncentraciji ne smije se izlagati više od tri mužjaka i tri ženke. Studija za utvrđivanje raspona treba trajati najmanje pet dana i općenito ne dulje od 14 dana. U izvješću o studiji treba pružiti argumentaciju za odabir koncentracije za glavnu studiju. Cilj glavne studije jest pokazati odnos koncentracije i reakcije temeljen na očekivanjima za najosjetljiviji krajnji učinak. Niska koncentracija idealno bi trebala biti koncentracija s neopaženim štetnim učincima dok visoka koncentracija treba izazvati nedvojbenu toksičnost bez izazivanja pretjeranog stresa za životinje ili bez utjecaja na njihovu dugovječnost (3).

▼M4

13. Pri odabiru razina koncentracije za studiju za utvrđivanje raspona u obzir treba uzeti sve raspoložive informacije uključujući odnose strukture i aktivnosti te podatke za slične kemikalije (vidjeti stavak 3.). Studija za utvrđivanje raspona može potvrditi/opovrgnuti mehanistički utemeljene krajnje učinke koje se smatra najosjetljivijima, npr. inhibiciju kolinesteraze organofosfatima, formaciju methemoglobina eritrocitotoksičnim agensima, hormone štitnjače (T_3, T_4) za tirotoksikante, proteine, LDH ili neutrofile u bronhoalveolarnom ispiranju za neškodljive, slabo topljive čestice ili aerosole koji nadražuju pluća.

Glavna studija

14. Glavna studija subakutne toksičnosti općenito obuhvaća tri razine koncentracije kao i paralelnu negativnu kontrolu (zrak) i/ili kontrolu nosača po potrebi (vidjeti stavak 17.). Sve raspoložive podatke treba upotrijebiti kao pomoć pri odabiru odgovarajućih razina izlaganja, uključujući rezultate sustavnih studija toksičnosti, metabolizma i kinetike (poseban naglasak treba staviti na izbjegavanje visokih razina koncentracije koje zasićuju kinetičke procese). Svaka ispitna skupina sadrži najmanje deset glodavaca (pet mužjaka i pet ženki) koji se izlažu ispitivanoj kemikaliji šest sati dnevno pet dana u tjednu u razdoblju od četiri tjedna (ukupno trajanje studije 28 dana). Životinje se mogu također izlagati i sedam dana tjedno (npr. kada se ispituju inhalirani lijekovi). Ako je za jedan od spolova poznato da je osjetljiviji na ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje, spolovi se mogu izlagati različitim razinama koncentracije kako bi se optimizirao odnos koncentracije i reakcije, kao što je opisano u stavku 15. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanje izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Ako se primjenjuje izlaganje kraće od šest sati dnevno ili ako je potrebno provesti dugotrajno izlaganje (npr. 22 sata dnevno) u sklopu studije izlaganja čitavim tijelom [vidjeti GD 39 (2)], treba pružiti argumente. Tijekom izlaganja treba obustaviti davanje hrane osim ako izlaganje nije dulje od šest sati. Voda se može davati tijekom cijelog izlaganja čitavim tijelom.

15. Odabrane ciljane koncentracije moraju identificirati ciljni(-e) organ(-e) i pokazati jasan odnos koncentracije i reakcije:

— Visoka razina koncentracije trebala bi rezultirati toksičnim učincima, ali ne izazvati znakove dugotrajnosti ili smrtnosti koji bi spriječili suvislu ocjenu.

— Srednju(-e) razinu(-e) koncentracije trebalo bi prorijediti kako bi se proizvelo stupnjevanje toksičnih učinaka između visoke i niske koncentracije.

— Niska koncentracija treba pružiti malo ili nimalo dokaza o toksičnosti.

Satelitska (reverzibilna) studija

16. Satelitska (reverzibilna) studija može se primijeniti kako bi se promatrala reverzibilnost, postojanost ili zakašnjelo pojavljivanje toksičnosti u razdoblju nakon tretiranja, odgovarajućeg trajanja, ali ne kraćeg od 14 dana. Satelitske (reverzibilne) skupine sastoje se od pet mužjaka i pet ženki koji se izlažu istodobno s pokusnim životinjama u glavnoj studiji. Skupine za satelitsku (reverzibilnu) studiju treba izlagati ispitivanoj kemikaliji na najvišoj razini koncentracije i moraju se provoditi paralelne kontrole zraka i/ili nosača (vidjeti stavak 17.).

▼M4

Kontrolne životinje

17. Sa životinjama iz paralelnih negativnih kontrola (zrak) treba postupati na jednak način kao i sa životinjama iz ispitne skupine osim što ih se izlaže filtriranom zraku, a ne ispitivanoj kemikaliji. Ako se voda ili druga tvar primjenjuje kao pomoć u stvaranju ispitne atmosfere, u studiju treba uključiti kontrolni nosač umjesto negativne (zrak) kontrolne skupine. Kada god je to moguće, kao nosač treba upotrebljavati vodu. Kada se kao nosač koristi voda, životinje iz kontrolne skupine treba izlagati zraku jednake relativne vlažnosti kao i izložene skupine. Odabir prikladnog nosača treba se temeljiti na prikladno provedenoj predstudiji ili povijesnim podacima. Ako nije poznata toksičnost medija, voditelj istraživanja može odlučiti da upotrijebi negativnu (zrak) kontrolu i kontrolu nosača, ali to se izričito destimulira. Ako povijesni podaci pokažu da nosač nije toksičan, nema potrebe za negativnom (zrak) kontrolnom skupinom i treba rabiti samo kontrolu nosača. Ako predstudija ispitivane kemikalije formulirane u nosaču ne pokaže nikakvu toksičnost, znači da nosač nije toksičan u ispitnoj koncentraciji te stoga ne treba provoditi kontrolu nosača.

UVJETI IZLAGANJA

Primjena koncentracija

18. Životinje se izlažu ispitivanoj kemikaliji u vidu plina, pare, aerosola ili njihovih smjesa. Fizikalno stanje koje će se ispitivati ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, odabranoj koncentraciji i/ili fizikalnom obliku koji je obično prisutan tijekom manipulacije ispitivanom kemikalijom i njezine uporabe. Higroskopske i kemijski reaktivne ispitivane kemikalije treba ispitivati u uvjetima suhog zraka. Treba paziti kako bi se izbjeglo stvaranje eksplozivnih koncentracija. Materijal u česticama može se podvrgnuti mehaničkim procesima za smanjenje veličine čestica. Ostale upute nalaze se u GD 39 (2).

Distribucija veličine čestica

19. Određivanje veličine čestica treba provesti za sve aerosole i pare koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Kako bi se omogućilo izlaganje svih relevantnih područja respiratornog trakta, preporuča se aerosol sa srednjim aerodinamičkim promjerom čestica (MMAD) u rasponu od 1 do 3 μm s geometrijskom standardnom devijacijom (σ_g) u rasponu od 1,5 do 3,0 (4). Iako treba učiniti razuman napor za postizanje tih standarda, ako se ne mogu postići, treba podnijeti stručno mišljenje. Primjerice, metalne čestice u isparini mogu biti manje od tog standarda, a napunjene čestice i vlakna mogu biti veći.

Priprema ispitivane kemikalije u nosaču

20. Idealno bi bilo da se ispitivana kemikalija ispituje bez nosača. Ako je potrebno primijeniti nosač za stvaranje odgovarajuće koncentracije ispitivane tvari i veličine čestica, prednost treba dati vodi. Kad god se ispitivana kemikalija otapa u nosaču, treba dokazati njegovu stabilnost.

PRAĆENJE UVJETA IZLAGANJA

Protok zraka u komori

21. Protok zraka u komori za izlaganje treba pažljivo kontrolirati, neprestano nadzirati te bilježiti najmanje jedanput u sat vremena tijekom svakog izlaganja. Nadziranje koncentracije (ili privremene stabilnosti) u ispitnoj atmosferi, provedeno u stvarnom vremenu, sastavna je mjera svih dinamičkih parametara i pruža neizravno sredstvo za kontrolu svih relevantnih parametara dinamičke inhalacije. Ako se koncentracija nadzire u stvarnom vremenu, učestalost mjerenja protoka zraka može se smanjiti na jedno

▼M4

mjerenje po izlaganju dnevno. Posebnu pažnju treba obratiti na izbjegavanje ponovnog udisanja u komorama za izlaganje samo nosom. Koncentracija kisika mora iznositi najmanje 19 %, a koncentracija ugljikova dioksida ne smije premašivati 1 %. Ako postoji opravdana sumnja da se takav standard ne može postići, treba mjeriti koncentraciju kisika i ugljikova dioksida. Ako mjerenja prvog dana izlaganja pokažu da su plinovi na pravilnoj razini, nisu potrebna daljnja mjerenja.

Temperatura i relativna vlažnost zraka u komori

22. Temperaturu u komori treba održavati na 22 ± 3 °C. Relativnu vlažnost zraka u području udisanja životinja za izlaganje samo nosom i čitavim tijelom treba neprestano nadzirati i bilježiti svakoga sata tijekom svakog izlaganja kad je to moguće. Relativnu vlažnost zraka trebalo bi po mogućnosti održavati u rasponu od 30 do 70 %, no to može biti nemoguće (npr. u slučaju ispitivanja smjesa na bazi vode) ili nemjerljivo zbog utjecanja na ispitivanu kemikaliju pomoću ispitne metode.

Ispitivana kemikalija: Nazivna koncentracija

23. Kad god je to moguće, treba izračunati i zabilježiti nazivnu koncentraciju u komori za izlaganje. Nazivna koncentracija jest masa proizvedene ispitivane kemikalije podijeljena ukupnim volumenom zraka koji je prošao kroz sustav komore. Nazivna se koncentracija ne koristi za karakterizaciju izlaganja životinja nego usporedba nazivne koncentracije i stvarne koncentracije daje uvid u učinkovitost proizvodnje sustava ispitivanja te se stoga može upotrijebiti za otkrivanje problema pri proizvodnji.

Ispitivana kemikalija: Stvarna koncentracija

24. Stvarna koncentracija jest koncentracija ispitivane kemikalije uzorkovana u zoni udisanja životinja u komori za inhalaciju. Stvarna koncentracija može se dobiti specifičnim metodama (npr. izravnim uzorkovanjem, adsorpcijskim ili kemijskim reaktivnim metodama te analitičkom karakterizacijom nakon toga) ili nespecifičnim metodama poput gravimetrijske analize filtra. Primjena gravimetrijske analize prihvatljiva je samo za aerosole sa samo jednom komponentom u prahu ili aerosole tekućina niskog stupnja hlaplji-vosti i treba je podržati odgovarajućom preliminarnom karakterizacijom specifičnom za ispitivanu kemikaliju. Gravimetrijskom analizom može se odrediti i koncentracija aerosola s višekomponentnim prahom. No, za to su potrebni analitički podaci koji pokazuju da je sastav materijala koji se prenosi zrakom sličan početnom materijalu. Ako ta informacija nije dostupna, potrebna je ponovna analiza ispitivane kemikalije (idealno u stanju kada se prenosi zrakom) u pravilnim intervalima tijekom ispitivanja. Za agense, pod utjecajem aerosola, koji mogu ispariti ili sublimirati treba pokazati da su odabranom metodom skupljene sve faze.

25. Ako je moguće, tijekom trajanja studije treba upotrijebiti jednu partiju ispitivane kemikalije, a ispitivani uzorak treba skladištiti u uvjetima u kojima će biti očuvana njegova čistoća, homogenost i stabilnost. Prije početka studije treba karakterizirati ispitivanu kemikaliju uključujući njezinu čistoću, ako je tehnički izvedivo, identitet te količine identificiranih kontaminirajućih tvari i nečistoća. To se može dokazati sljedećim podacima, ali nije ograničeno na njih: vrijeme retencije i relativno vršno područje, molekulska masa iz spektroskopskog mjerenja ili kromatografske analize plina ili sličnih procjena. Iako identitet ispitivanog uzorka nije odgovornost ispitnog laboratorija, za laboratorij može biti mudro barem u ograničenim okvirima potvrditi naručiteljevu karakterizaciju (npr. boju, fizikalno stanje itd.).

▼M4

26. Atmosferu izlaganja treba održavati konstantnom koliko je god moguće. Uređaj za nadzor u stvarnom vremenu, kao što je fotometar za aerosol ili uređaj za analizu ukupnih ugljikovodika za paru, može se upotrijebiti za dokazivanje stabilnosti uvjeta izlaganja. Stvarnu koncentraciju u komori treba mjeriti najmanje 3 puta tijekom svakog dana izlaganja za svaku razinu izlaganja. Ako to nije izvedivo zbog ograničenog protoka zraka ili niskih koncentracija, prihvatljiv je jedan uzorak po razdoblju izlaganja. Uzorak se u idealnom slučaju uzima tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Pojedinačni uzorci koncentracije u komori ne smiju od srednje koncentracije u komori odstupati za više od ± 10 % za plinove i pare i ne za više od ± 20 % za tekućine ili kruti aerosol. Treba izračunati i zabilježiti vrijeme za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}). Trajanje izlaganja zahvaća vrijeme proizvodnje ispitivane kemikalije. Pritom se vodi računa o vremenu potrebnom za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}) i vremenu raspada. Smjernica za procjenu t_{95} može se pronaći u GD 39 (2).

27. Za vrlo složene smjese sastavljene od plinova/para i aerosola (npr. zapaljive atmosfere i i ispitivane kemikalije izbačene iz namjenskih proizvoda/uređaja za krajnju uporabu) svaka se faza može ponašati drukčije u komori za inhalaciju. Stoga treba odabrati najmanje jedan indikator (analiziranu tvar), obično glavnu aktivnu tvar u smjesi, svake faze (plin/para i aerosol). Kada je ispitivana kemikalija smjesa, treba izvijestiti o analitičkoj koncentraciji ukupne smjese, a ne samo za aktivni sastojak ili indikator (analiziranu tvar). Dodatne informacije o stvarnim koncentracijama mogu se pronaći u GD 39 (2).

Ispitivana kemikalija: Distribucija veličine čestica

28. Distribuciju veličine čestica u aerosolu treba odrediti najmanje jedanput tjedno za svaku razinu koncentracije uporabom kaskadnog impaktora ili alternativnog instrumenta poput uređaja za aerodinamičku analizu veličine čestica (APS). Ako se može dokazati da su rezultati dobiveni kaskadnim impaktorom i alternativnim instrumentom ekvivalentni, u studiji se može upotrebljavati alternativni instrument.

29. Drugi uređaj, poput gravimetrijskog filtra ili uređaja za sudaranje/uređaja za mjerenje mjehurića plina, treba upotrijebiti paralelno s primarnim instrumentom kako bi se potvrdila učinkovitost skupljanja primarnog instrumenta. Koncentracija mase dobivena analizom veličine čestica trebala bi biti u razumnim granicama koncentracije mase dobivene analizom filtracijom [vidjeti GD 39 (2)]. Ako se ekvivalentnost može dokazati na svim koncentracijama ispitanima u ranoj fazi istraživanja, mogu se izostaviti daljnja mjerenja radi potvrde. Radi dobrobiti životinja treba provoditi mjerenja kako bi se minimalizirali nedefinitivni podaci koji mogu izazvati potrebu za ponavljanjem studije.

30. Određivanje veličine čestica treba provesti za pare ako postoji ikakva mogućnost da bi kondenzacijom pare mogao nastati aerosol ili ako su u čestice otkrivene u atmosferi pare s potencijalom za miješane faze.

OPAŽANJA

31. Životinje treba klinički promatrati prije, tijekom i nakon razdoblja izlaganja. Češća opažanja mogu biti potrebna ovisno o reakciji životinja tijekom izlaganja. Ako primjena cijevi koje sputavaju, slabo osvijetljenih komora za čitavo tijelo ili neprozirna atmosfera ometaju opažanje na životinjama, opažanje treba pažljivo obaviti nakon izlaganja. Opažanja prije izlaganja sljedećeg dana mogu ocijeniti reverzibilnost ili pogoršanje toksičnih učinaka.

▼M4

32. Sva se opažanja bilježe u pojedinačnim evidencijama za svaku životinju. Ako se životinje usmrte zbog humanih razloga ili ih se pronađe uginule, vrijeme ugibanja treba zabilježiti što je moguće preciznije.

33. Opažanja u kavezu moraju uključivati promjene na koži i krznu, očima i sluznicama te promjene u dišnom i cirkulacijskom sustavu, promjene u živčanom sustavu te promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i uzorcima ponašanja. Treba obratiti pozornost na opažanje tremora, konvulzija, salivacije, dijareje, letargije, spavanja i kome. Mjerenje rektalne temperature može pružiti dodatne dokaze o refleksnoj bradipneji ili hipo/hipertermiji povezanoj s tretiranjem ili držanjem u zatvorenom. U protokol studije mogu se uključiti i dodatna određivanja, kao što su kinetika, biološki monitoring, funkcija pluća, retencija slabo topljivih materijala koji se nakupljaju u plućnom tkivu te promjene u ponašanju.

TJELESNA MASA

34. Pojedinačnu masu životinja treba zabilježiti neposredno prije prvog izlaganja (0. dan), dvaput tjedno nakon toga (primjerice, petkom i ponedjeljkom kako bi se dokazao oporavak preko vikenda bez izlaganja ili u vremenskom razdoblju koje omogućuje utvrđivanje sistemske toksičnosti) te u vrijeme uginuća ili usmrćenja. Ako u prva dva tjedna nema učinaka, tijekom ostatka studije tjelesna se masa može mjeriti jedanput tjedno. Satelitske (reverzibilne) životinje (ako se koriste) treba nastaviti vagati jedanput tjedno tijekom čitavog razdoblja oporavka. Na kraju istraživanja sve životinje treba izvagati kratko prije usmrćenja kako bi se omogućilo nepristrano određivanje odnosa mase organa i tjelesne mase.

UNOS HRANE I VODE

35. Unos hrane treba mjeriti jedanput tjedno. Također se može mjeriti i unos vode.

KLINIČKA PATOLOGIJA

36. Kliničko-patološke pretrage treba obaviti za sve životinje uključujući kontrolnu i satelitsku (reverzibilnu) skupinu u trenutku usmrćivanja. Treba zabilježiti vremensko razdoblje između kraja izlaganja i prikupljanja krvi, posebno ako je rekonstrukcija ciljanog krajnjeg učinka brza. Uzorkovanje nakon završetka izlaganja indicirano je za parametre s kratkim poluvremenom plazme (npr. COHb, CHE, i MetHb).

37. U tablici 1. navedeni su kliničko-patološki parametri koji se općenito traže za sva toksikološka ispitivanja. Analiza urina ne traži se rutinski, ali se može provesti ako se smatra korisnom na temelju očekivane ili opažene toksičnosti. Voditelj istraživanja može odlučiti da odredi i dodatne parametre radi bolje karakterizacije toksičnosti ispitivane kemikalije (npr. kolinesteraza, lipidi, hormoni, ravnoteža kiselina i lužina, methemoglobin ili Heinzova tjelešca, kreatin kinaza, omjer mijeloida i eritroida, troponin, plinovi u arterijskoj krvi, laktat dehidrogenaza, sorbitol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza i gama glutamil transpeptidaza).

▼M4

Tablica 1.

Standardni kliničko-patološki parametri

Hematologija	
Broj eritrocita	Ukupni broj leukocita
Hematokrit	Diferencijalni broj leukocita
Koncentracija hemoglobina	Broj trombocita
Prosječna masa hemoglobina	Vrijeme zgrušavanja (odabrati jedno):
Prosječni volumen eritrocita	— Protrombinsko vrijeme
Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima	— Vrijeme zgrušavanja
Retikulociti	— Parcijalno tromboplastinsko vrijeme

Klinička kemija	
Glukoza (*)	Alanin aminotransferaza
Ukupni kolesterol	Aspartat aminotransferaza
Trigliceridi	Alkalna fosfataza
Dušična urea u krvi	Kalij
Ukupni bilirubin	Natrij
Kreatinin	Kalcij
Ukupni proteini	Fosfor
Albumini	Kloridi
Globulini	

Analiza urina (opcija)	
Izgled (boja i zamućenost)	Ukupni proteini
Volumen	Glukoza
Specifična težina ili osmolalnost	Krv/krvne stanice
pH	

(*) Budući da dulji post može izazvati pristranost u mjerenju glukoze za tretirane i kontrolne životinje, voditelj istraživanja treba odrediti trebaju li životinje postiti. Ako se primjenjuje razdoblje posta, ono treba biti primjereno korištenim vrstama; za štakore to može biti 16 h (post preko noći). Određivanje glukoze u razdoblju posta može se provesti nakon prekonoćnog posta u zadnjem tjednu izlaganja ili nakon prekonoćnog posta prije obdukcije (u posljednjem slučaju zajedno sa svim ostalim kliničko-patološkim parametrima).

38. Ako postoji dokaz da je donji respiratorni trakt (tj. alveole) primarno mjesto taloženja i retencije, bronhoalveolarno ispiranje (BAL) može biti tehnika izbora za kvantitativnu analizu hipotetski utemeljenih parametara učinka doze fokusiranih na alveolitis, upalu pluća i fosfolipidozu. To omogućuje prikladno i temeljito istraživanje promjena u ozljedama na alveolama povezanih s reakcijama na dozu i protok vremena. Tekućina za BAL mora se analizirati radi ukupnog i diferencijalnog broja leukocita, ukupnog broja proteina i laktat dehidrogenaze. Drugi parametri koji se mogu uzeti u obzir jesu parametri indikativni za lizosomalne bolesti, fosfolipidozu te iritacijske ili alergijske upale koje mogu uključivati određivanje proupalnih citokineza/kemokineza. Mjerenja BAL obično upotpunjuju rezultate histopatoloških pretraga, ali ih ne mogu zamijeniti. Upute za provođenje ispiranja pluća nalaze se u GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPSKA PATOLOGIJA I MASA ORGANA

39. Sve pokusne životinje, uključujući i one koje su tijekom ispitivanja uginule ili su uklonjene iz studije radi svoje dobrobiti, treba podvrgnuti kompletnim pretragama (ako je izvedivo) i makroskopskoj analizi. Treba zabilježiti vrijeme između kraja posljednjeg izlaganja svake životinje i njezina usmrćivanja. Ako se obdukcija ne može provesti neposredno nakon otkrića uginule životinje, životinju treba ohladiti (ne zamrznuti) na dovoljno niskim temperaturama kako bi se razgradnja svela na minimum. Obdukciju treba provesti što je moguće prije, obično u roku od jednog ili dva dana. Za svaku životinju treba zabilježiti sve makroskopske patološke promjene uz poseban naglasak na promjenama u respiratornom traktu.

40. U tablici 2. nalazi se popis organa i tkiva koje tijekom makroskopske analize treba sačuvati u odgovarajućem mediju radi histopatoloških pretraga. Čuvanje [točno određenih] organa i tkiva te drugih organa i tkiva prepušteno je voditelju istraživanja. **Masno otisnute** organe treba obrezati i izvagati što je moguće prije nakon sekcije kako bi se izbjeglo njihovo sušenje. Štitnjaču i epididimise treba izvagati samo ako je potrebno jer obrezivanje artefakata može spriječiti histopatološku procjenu. Tkiva i organe treba fiksirati u puferiranom 10 % formalinu ili drugom prikladnom fiksativu odmah nakon provedene obdukcije, i to, dakle, ne kraće od 24 - 48 sati prije obrezivanja ovisno o primijenjenom fiksativu.

Tablica 2.

Organi i tkiva sačuvani tijekom makroskopske analize

Nadbubrežne žlijezde	Sjemenski mjehurići
Koštana srž (i/ili svježi aspirat)	Kralježnica (vratna, srednja prsna i slabinska)
Mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	**Slezena**
[Oči (mrežnica, očni živac) i očni kapci]	Želudac
Srce	**Testisi**
Bubrezi	**Timus**
Grkljan (3 razine, 1 razina za uključivanje u bazu epiglotisa)	Štitnjača
Jetra	Dušnik (najmanje 2 razine uključujući 1 longitudinalnu sekciju kroz greben i 1 transverzalnu sekciju)
Pluća (svi režnjevi na jednoj razini, uključujući glavni bronh)	[Mokraćni mjehur]
Limfni čvorovi iz hilusne regije pluće, posebno za slabo topljive ispitivane kemikalije u česticama, za dublje pretrage i/ili studije s imunološkim fokusom u obzir se mogu uzeti dodatni limfni čvorovi, npr. limfni čvorovi iz medijastinalne, cervikalne/submandibularne i/ili aurikularne regije.	Maternica
Nazofaringealna tkiva (najmanje 4 razine: 1 razina za uključivanje nazofaringealnog kanala i nazalno limfatičko tkivo (NALT))	Sve makroskopske lezije
Jednjak	
[Olfaktorni bulbus]	
Jajnici	

▼M4

41. Pluća treba ukloniti netaknuta, izvagati te polako nalijevati prikladnim fiksativom pod tlakom od 20 - 30 cm vode kako bi se osiguralo održanje strukture pluća (5). Sekcije treba prikupiti za sve režnjeve jedne razine, uključujući glavni bronh, ali ako je provedeno ispiranje pluća, neisprani režanj treba secirati na tri razine (ne serijske sekcije).

42. Treba ispitati najmanje 4 razine nazofaringealnih tkiva, a jedna od njih mora uključivati nazofaringealni kanal (5, 6, 7, 8, 9) kako bi se omogućilo potpuno ispitivanje ljuskavog, tranzicijskog (necilijarnog respiratornog), respiratornog (cilijarnog respiratornog) i olfaktornog epitela te drenažno limfatično tkivo (NALT; 10, 11). Treba ispitati tri razine grkljana, a jedna od njih mora obuhvaćati bazu epiglotisa (12). Treba ispitati najmanje dvije razine dušnika uključujući jednu longitudinalnu sekciju kroz greben mjesta razdvajanja ekstrapulmonalnog bronha te jednu transverzalnu sekciju.

HISTOPATOLOGIJA

43. Treba provesti histopatološku procjenu svih organa i tkiva navedenih u tablici 2. za kontrolnu skupinu i skupinu izloženu visokoj koncentraciji te za sve životinje koje uginu ili su usmrćene tijekom studije. Posebnu pozornost treba posvetiti respiratornom traktu, organima metama te makroskopskim lezijama. Organe i tkiva s lezijama u skupini izloženoj visokoj koncentraciji treba ispitati u svim skupinama. Voditelj istraživanja može odlučiti provesti histopatološke pretrage za dodatne skupine kako bi dokazao jasnu reakciju na koncentraciju. Ako se upotrebljava satelitska (reverzibilna) skupina, histopatološku procjenu treba provesti na svim tkivima i organima za koje je u tretiranim skupinama utvrđeno da pokazuju učinke. U slučaju pojavljivanja prekomjernog broja uginulih životinja ili drugih problema u skupini izloženoj visokoj koncentraciji, koje kompromitiraju značenje podataka, histopatološku analizu treba provesti na sljedećoj nižoj koncentraciji. Treba pokušati povezati makroskopska opažanja s mikroskopskim nalazima.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

44. Treba navesti individualne podatke o tjelesnoj masi, potrošnji hrane, kliničkoj patologiji, makroskopskoj patologiji, masi organa te histopatologiji. Podatke prikupljene kliničkim promatranjem treba skupiti u obliku tablice, prikazujući za svaku ispitnu skupinu broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje pokazuju specifične znakove toksičnosti, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme uginuća pojedinih životinja, opis i vremenski tijek te reverzibilnost toksičnih učinaka i nalaze obdukcije. Sve rezultate, kvantitativne i popratne, treba ocijeniti odgovarajućom statističkom metodom. Može se upotrijebiti bilo koja opće prihvaćena statistička metoda, a statističke metode treba odabrati tijekom planiranja studije.

Izvješće o ispitivanju

45. Izvješće o ispitivanju treba, ako je primjereno, sadržavati sljedeće informacije:

Pokusne životinje i njihov uzgoj

— Opis uvjeta držanja u kavezu, uključujući: broj (ili promjenu broja) životinja u svakom kavezu, materijal podloge, temperaturu i relativnu vlažnost zraka u kavezu, razdoblje svjetla i tame, identifikaciju prehrane.

▼M4

— Korištena vrsta/soj i obrazloženje za uporabu druge vrste osim štakora. Mogu se navesti podrijetlo i povijesni podaci ako potječu od životinja izloženih u sličnim uvjetima izlaganja, smještaja i posta.

— Broj, dob i spol životinja.

— Metoda nasumičnog odabira.

— Opis svih kondicioniranja prije ispitivanja, uključujući prehranu, karantenu i liječenje bolesti.

Ispitivana kemikalija

— Fizikalna narav, čistoća te, ako je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući izomerizaciju).

— Identifikacijski podaci i broj registracije Chemical Abstract Services (CAS) ako je poznat.

Nosač

— Obrazloženje za uporabu nosača i obrazloženje za odabir nosača (ako nije voda).

— Povijesni ili odgovarajući podaci koji pokazuju da nosač ne ometa rezultate studije.

Komora za inhalaciju

— Detaljan opis komore za inhalaciju, uključujući volumen i dijagram.

— Podrijetlo i opis opreme korištene za izlaganje životinja te stvaranje atmosfere.

— Oprema za mjerenje temperature, vlažnosti, veličine čestica te stvarne koncentracije.

— Izvor zraka i sustav za klimatizaciju.

— Metode korištene za kalibriranje opreme radi osiguravanja homogene atmosfere za ispitivanje.

— Razlika u tlaku (pozitivna ili negativna).

— Otvori za izlaganje po komori (samo nos); lokacija životinja u sustavu (čitavo tijelo).

— Stabilnost ispitne atmosfere.

— Lokacija senzora temperature i vlažnosti te uzorkovanje ispitne atmosfere u komori.

— Tretiranje dovodnog/ekstrahiranog zraka.

— Količina protoka zraka, otvor za količinu protoka zraka po izlaganju (samo nos) ili dovod životinja po komori (čitavo tijelo).

— Vrijeme za postizanje ravnoteže u komori za inhalaciju (t95).

— Broj promjena u volumenu po satu.

— Uređaji za mjerenje (ako je primjenjivo).

Podaci o izlaganju

— Argumentacija za odabir ciljane koncentracije u glavnoj studiji.

▼M4

— Nazivne koncentracije (ukupna masa ispitivane kemikalije proizvedena u komori za inhalaciju podijeljena volumenom zraka koji je prošao kroz komoru).

— Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije iz zone udisanja životinja; za smjese koje stvaraju heterogene fizikalne oblike (plinove, pare, aerosol) svaka se može analizirati odvojeno.

— Sve koncentracije zraka treba navesti u jedinicama mase (mg/l mg/m^3 itd.), a ne u jedinicama volumena (ppm, ppb itd.).

— Distribucija veličine čestica, srednji aerodinamički promjer čestica (MMAD) te geometrijska standardna devijacija (σ_g) uključujući metode za njihov izračun. Treba prikazati pojedinačne analize veličine čestica.

Uvjeti ispitivanja

— Pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije, uključujući pojedinosti o svim postupcima korištenim za smanjenje veličine čestica krutina ili za pripremu otopina ispitivane kemikalije.

— Opis (po mogućnosti uz dijagram) opreme korištene za stvaranje ispitne atmosfere te izlaganje životinja ispitnoj atmosferi.

— Pojedinosti o opremi korištenoj za nadziranje temperature, vlažnosti i protoku zraka u komori (tj. razvoj kalibracijske krivulje).

— Pojedinosti o opremi korištenoj za skupljanje uzoraka za određivanje koncentracije u komori i distribuciju veličine čestica.

— Pojedinosti o korištenoj kemijskoj analitičkoj metodi i potvrdi metode (uključujući učinkovitost rekuperacije ispitivane kemikalije iz medija za uzorkovanje).

— Metoda nasumičnog odabira za svrstavanje životinja u ispitnu i kontrolnu skupinu.

— Pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući tip/izvor hrane, izvor vode).

— Argumentacija za odabir ispitnih koncentracija.

Rezultati

— Tablični prikaz temperature, vlažnosti zraka i protoka zraka u komori.

— Tablični prikaz podataka o nazivnoj i stvarnoj koncentraciji u komori.

— Tablični prikaz podataka u veličini čestica, uključujući podatke o skupljenim analitičkim uzorcima, distribuciju veličina čestica te izračune MMAD i σ_g.

— Tablični prikaz podataka o reakciji i razini koncentracije za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti uključujući smrtnost, narav, stupanj, vrijeme nastupanja i trajanja učinaka).

▼M4

— Tablični prikaz pojedinačne mase životinja.

— Tablični prikaz unosa hrane.

— Tablični prikaz kliničko-patoloških podataka.

— Nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju ako su dostupni.

— Tablični prikaz svih ostalih izmjerenih parametara.

Rasprava i tumačenje rezultata

— Poseban naglasak treba staviti na opis metoda korištenih za ispunjavanje kriterija ove ispitne metode, npr. graničnu koncentraciju ili veličinu čestica.

— Treba raspravljati o sposobnosti udisanja čestica u svjetlu općih nalaza, posebno ako se nisu mogli ispuniti kriteriji za veličinu čestica.

— U opću ocjenu studije treba uključiti dosljednost metoda korištenih za određivanje nazivnih i stvarnih koncentracija te odnos stvarne koncentracije prema nazivnoj.

— Treba se pozabaviti uzrokom smrti i prevladavajućim načinom djelovanja (sistemski u odnosu na lokalni).

— U slučaju humanog usmrćivanja životinja koje su patile ili pokazivale znakove velikog i trajnog stresa treba pružiti objašnjenje na temelju kriterija iz Smjernice za humano usmrćivanje OECD-a (3).

— Treba identificirati organ/e metu/e.

— Treba odrediti NOAEL i LOAEL.

LITERATURA

1. OECD (1981.). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Pariz.

2. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

4. Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, str. 229-258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13. Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, kojom se izmjenjuju i dopunjuju i ukidaju Direktiva 67/548/EEZ i 1999/45/EZ te izmjenjuje i dopunjuje Uredba (EZ) br. 1907/2006, SL L 353, 31.12.2008., str. 1.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼B

B.9. **TOKSIČNOST (DERMALNA) PRI PONAVLJANOJ DOZI (28 DANA)**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (A).

1.2. DEFINICIJE

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (B).

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana se tvar 28 dana svakodnevno nanosi na kožu nekoliko skupina pokusnih životinja u stupnjevanim dozama, pri čemu se na svaku skupinu primjenjuje po jedna visina doze. Tijekom razdoblja nanošenja tvari, životinje se svaki dan opažaju kako bi se otkrili znakovi toksičnosti. Životinje koje uginu tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a po završetku ispitivanja životinje koje su preživjele ispitivanje usmrćuju se i obduciraju.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Priprema**

Životinje se drže u pokusnim uvjetima u pogledu smještaja i hranjenja najmanje pet dana prije početka pokusa. Prije ispitivanja zdrave mlade životinje nasumce se odabiru i raspoređuju u skupine za tretiranje i u kontrolne skupine. Neposredno prije ispitivanja na hrptenom dijelu trupa pokusnih životinja ošiša se dlaka. Dlaka se može i obrijati, ali to treba napraviti približno 24 sata prije ispitivanja. Šišanje ili brijanje treba ponavljati otprilike svaki tjedan. Pri šišanju ili brijanju dlake treba paziti da se ne ostruže koža. Za nanošenje ispitivane tvari najmanje 10 % tjelesne površine mora biti bez dlake. Pri odlučivanju o površini s koje će odstraniti dlaka i o dimenzijama krpice kojom će se ta površina prekriti treba uzeti u obzir tjelesnu masu životinje. Kad se ispituju krute tvari koje se prema potrebi mogu usitniti u prah, ispitivanu tvar treba u dovoljnoj mjeri navlažiti vodom ili, tamo gdje je to potrebno, odgovarajućim nosačem kako bi se osigurao dobar kontakt s kožom. Tekuće ispitivane tvari općenito se primjenjuju nerazrijeđene. Ispitivana se tvar nanosi jednom na dan, pet do sedam dana u tjednu.

1.6.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.6.2.1. *Pokusne životinje*

Mogu se koristiti odrasli štakori ili kunići. Moguće je koristiti i druge vrste, ali je za to potrebno navesti opravdane razloge.

▼B

Na početku studije tjelesna masa korištenih životinja ne smije varirati za više od ± 20 % odgovarajuće srednje vrijednosti.

1.6.2.2. *Broj i spol*

Za svaku visinu doze treba upotrijebiti najmanje 10 životinja (pet ženki i pet mužjaka) koji imaju zdravu kožu. Ženke ne smiju prethodno imati potomstvo i ne smiju biti gravidne. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, prije završetka studije, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđen za takvo usmrćivanje. Osim toga, jednu se satelitsku skupinu od 10 životinja (po pet od svakog spola) može tretirati visokom dozom 28 dana, te nakon tretiranja opažati s obzirom na reverzibilnost, trajanje ili odgođenu pojavu toksičkih učinaka. Koristi se i jedna satelitska skupina od 10 kontrolnih životinja (po pet životinja od svakog spola).

1.6.2.3. *Visina doza*

Potrebne su najmanje 3 visine doza s jednom kontrolom ili, ako se koristi otapalo, s kontrolom koju čini otapalo. Izlaganje treba trajati najmanje šest sati dnevno. Ispitivanu tvar treba nanositi u približno isto vrijeme svaki dan, uz povremena podešavanja (u tjednim ili dvotjednim intervalima) kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Izuzimajući tretiranje ispitivanom tvari, sa životinjama iz kontrolne skupine treba postupati na jednak način kao sa životinjama koje se podvrgavaju ispitivanju. Ako se radi lakšeg doziranja koristi nosač, kontrolnoj skupini na koju se primjenjuje nosač doze se daju na jednak način kao i tretiranim skupinama i one moraju primiti iste količine kao skupina tretirana najvišom dozom. Najviša koncentracija treba izazvati toksičke učinke, ali smrtnih ishoda ne smije biti ili se mogu javiti u rijetkim slučajevima. Najniža koncentracija ne bi smjela izazvati nikakve znakove toksičkog učinka. Tamo gdje postoji primjenljiva procjena razine ljudske izloženosti, najniža koncentracija treba biti malo viša od te procijenjene razine. U idealnom slučaju, srednja bi koncentracija trebala proizvesti minimalne vidljive toksičke učinke. Ako se između najviše i najniže koncentracije koristi više od jedne koncentracije, one se moraju primjenjivati u intervalima, kako bi se njihovi toksički učinci mogli stupnjevati. U skupinama tretiranim niskim i srednjim dozama i u kontrolnim skupinama, stopa smrtnosti treba biti niska da bi ocjena rezultata uopće imala smisla.

Ako primjena ispitivane tvari izazove tešku nadraženost kože, koncentracije treba smanjiti, što može dovesti do smanjenja ili izostanka drugih toksičkih učinaka kod primjene visokih doza. Štoviše, ako dođe do jakog oštećenja kože, možda će trebati prekinuti studiju i započeti novu s nižim koncentracijama.

1.6.2.4. *Granični test*

Ako u preliminarnom ispitivanju primjena doze od 1 000 mg/kg ili više, doze vezane uz moguću ljudsku izloženost, ako je poznata, ne proizvede nikakve toksičke učinke, daljnje ispitivanje smatra se nepotrebnim.

1.6.2.5. *Razdoblje opažanja*

Opažanje pokusnih životinja radi otkrivanja znakova toksičnosti treba provoditi svakodnevno. Vrijeme smrti kao i vrijeme pojave i nestanka znakova toksičnosti treba zabilježiti.

▼B

1.6.3. **Postupak**

Životinje treba smjestiti u kaveze pojedinačno. U idealnim uvjetima, životinje se tretiraju sedam dana u tjednu, kroz vremensko razdoblje od 28 dana. Životinje iz bilo koje satelitske skupine koje su predviđene za dodatna opažanja treba držati dodatnih 14 dana bez tretiranja kako bi se utvrdio oporavak od toksičkih učinaka ili njihova trajnost. Izlaganje treba trajati najmanje šest sati dnevno.

Ispitivanu tvar treba jednakomjerno nanijeti na površinu koja čini približno 10 % ukupne tjelesne površine. Kod jako toksičnih tvari površina na koju se tvar nanosi može biti i manja, ali čim veći dio te površine treba prekriti što tanjim i jednakomjernijim slojem.

Tijekom izlaganja ispitivana tvar se drži u kontaktu s kožom pomoću poroznog obloga od gaze i samoljepljive trake koja ne nadražuje kožu. Ispitnu površinu treba dodatno prekriti na odgovarajući način kako bi oblog i ispitivana tvar ostali na mjestu i kako bi se osiguralo da životinje ne mogu ispitivanu tvar unijeti oralno. Da bi se životinju spriječilo da ispitivanu tvar unese oralnim putem mogu se upotrijebiti pomagala za sputavanje, ali potpuna imobilizacija nije preporučena metoda. Kao alternativno rješenje može se koristiti „zaštitni ovratnik”.

Na kraju razdoblja izloženosti ostatke ispitivane tvari treba ukloniti, ako je moguće vodom ili primjenom neke druge prikladne metode čišćenja kože.

Sve životinje treba opažati svaki dan i bilježiti znakove toksičnosti, navodeći vrijeme njihove pojave, stupanj i trajanje. Opažanje treba obuhvaćati promjene na koži i dlaci, očima i sluznicama, na dišnom i cirkulacijskom sustavu, te na autonomnom i centralnom živčanom sustavu, kao i promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i obrascu ponašanja. Svaki tjedan treba mjeriti tjelesnu masu životinja. Isto se tako preporučuje tjedno mjeriti unos hrane. Redovito je opažanje životinja neophodno da bi se spriječio gubitak životinja uslijed kanibalizma, autolize tkiva ili pogrešnog smještanja. Na kraju studije sve preživjele životinje iz nesatelitskih tretiranih skupina podvrgavaju se obdukciji. Životinje na umoru i životinje koje trpe jaki stres ili bol treba po uočavanju ukloniti, humano usmrtiti i obducirati.

Na kraju ispitivanja na svim životinjama, uključujući i kontrolne životinje, obavljaju se sljedeće pretrage:

(1) hematološke, koje uključuju najmanje utvrđivanje hematokrita, koncentracije hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita i mjerenje sposobnosti zgrušavanja;

(2) kliničke biokemijske pretrage krvi koje uključuju najmanje jedan parametar funkcije jetre i bubrega: serumsku alanin aminotransferazu (prije poznatu pod nazivom glutamat-piruvat transaminaza), serumsku aspartat aminotransferazu (prije poznatu pod nazivom glutamat-oksaloacetat transaminaza), dušik u ureji, albumin, kreatinin u krvi, ukupni bilirubin i ukupne serumske bjelančevine.

Druge pretrage koje mogu biti potrebne za adekvatnu toksikološku ocjenu uključuju određivanje kalcija, fosfora, klorida, natrija, kalija, glukoze (natašte), analizu lipida, hormona, ravnoteže kiselina i lužina, metemoglobina i aktivnosti kolinesteraze.

▼B

Za detaljnije proučavanje toksičkih učinaka mogu se po potrebi obaviti dodatne kliničke biokemijske analize.

1.6.4. **Makroskopska obdukcija**

Sve životinje iz studije treba podvrgnuti detaljnoj makroskopskoj obdukciji. Najmanje jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, pluća i testise treba izvagati mokre, čim prije nakon seciranja, kako bi se spriječilo njihovo isušivanje. Organe i tkiva, tj. normalnu i tretiranu kožu, jetru, bubrege, slezenu, testise, nadbubrežne žlijezde, srce i ciljne organe (to jest sve organe na kojima su vidljive makroskopske lezije i promjene u veličini) treba čuvati u odgovarajućem mediju za eventualne daljnje histopatološke pretrage.

1.6.5. **Histopatološki pregled**

Kod skupine tretirane visokim koncentracijama i kod kontrolne skupne treba obaviti histološki pregled sačuvanih organa i tkiva. Organi i tkiva s oštećenjima koja se mogu pripisati visokim koncentracijama ispitivane tvari moraju se detaljno ispitati i kod životinja iz skupina tretiranih niskim koncentracijama. Životinje iz satelitskih skupina treba histološki obraditi s posebnim naglaskom na one organe i tkiva kod kojih su u drugim tretiranim skupinama bili utvrđeni toksički učinci.

2. **PODACI**

Podatke je najbolje rezimirati u obliku tablice u kojoj je za svaku testiranu skupinu životinja prikazan broj životinja na početku ispitivanja i broj životinja koje pokazuju pojedine vrste lezija.

Sve dobivene rezultate treba ocijeniti prema odgovarajućoj statističkoj metodi. Može se koristiti bilo koja priznata statistička metoda.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati sljedeće informacije:

— podaci o životinjama (vrsta, soj, podrijetlo, okolišni uvjeti, prehrana itd.),

— uvjeti ispitivanja (uključujući vrstu obloga: okluzivni ili neokluzivni),

— visine doza (uključujući nosač, ako se koristio) i koncentracije,

— razina kod koje nema toksičkih učinaka, tamo gdje je to moguće,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i dozi,

— vrijeme smrti tijekom studije, odnosno podaci o preživljavanju životinja do kraja ispitivanja,

— toksički i drugi učinci,

— vrijeme opažanja svakog znaka abnormalnosti i kasnije promjene,

— podaci o hrani i tjelesnoj masi,

— obavljena hematološka ispitivanja i dobiveni rezultati,

▼B

— obavljena klinička biokemijska ispitivanja i dobiveni rezultati,

— nalazi obdukcije,

— detaljni opis svih histopatoloških nalaza,

— statistička obrada rezultata tamo gdje je to moguće,

— diskusija o rezultatima,

— tumačenje rezultata.

3.2. OCJENA I TUMAČENJE REZULTATA

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (D).

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B slovo (E).

▼M7

B.10. *IN VITRO* ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA KOD SISAVACA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 473 (2016.). Dio je serije metoda za ispitivanje genetske toksikologije. Razvijen je i dokument OECD-a u kojemu se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena tih smjernica za ispitivanje (1).

Svrha *in vitro* ispitivanja kromosomskih aberacija jest utvrđivanje kemikalija koje uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u uzgojenim stanicama sisavaca (2., 3. i 4.). Razlikujemo dva tipa strukturnih kromosomskih aberacija, kromosomski i kromatidni. Tijekom *in vitro* analiza kromosomskih aberacija može doći do pojave poliploidije (uključujući endoreduplikaciju). Iako aneugeni mogu izazvati poliploidiju, sama poliploidija nije pokazatelj aneugenog potencijala, već može jednostavno biti pokazatelj poremećaja staničnog ciklusa ili citotoksičnosti (5.). Ovo ispitivanje nije namijenjeno mjerenju aneuploidije. *In vitro* mikronukleus-test (6.) preporučuje se za otkrivanje aneuploidije.

U *in vitro* ispitivanju kromosomskih aberacija mogu se upotrebljavati kulture uspostavljenih staničnih linija ili primarne stanične kulture ljudskog podrijetla ili dobivene od glodavaca. Stanice za uporabu trebalo bi odabrati na temelju sposobnosti rasta u kulturi, stabilnosti kariotipa (uključujući broj kromosoma) i spontane učestalosti kromosomskih aberacija (7.). Podacima koji su dostupni u ovom trenutku ne omogućuje se davanje čvrstih preporuka, ali oni upućuju na to da je pri ocjenjivanju kemijskih opasnosti važno uzeti u obzir status proteina p53, genetsku (kariotipsku) stabilnost, sposobnost popravka DNK i podrijetlo stanica odabranih za ispitivanje (potječu li od sisavaca ili od ljudi). Stoga se korisnike ove ispitne metode potiče na to da u obzir uzmu utjecaj tih i drugih svojstava stanica na rezultate stanične linije u otkrivanju nastanka kromosomskih aberacija s razvojem znanja u tom području.

Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* općenito zahtijevaju uporabu egzogenih izvora metaboličke aktivacije osim ako stanice imaju metaboličko djelovanje u odnosu na ispitivane kemikalije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi mogli dovesti do lažnih pozitivnih rezultata, odnosno do oštećenja kromosoma koje nije uzrokovano izravnom interakcijom između ispitivanih kemikalija i kromosoma; takvi uvjeti uključuju promjene pH vrijednosti ili osmolalnosti (8., 9. i 10.), interakciju s komponentama podloge (11. i 12.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (13., 14., 15. i 16.).

Ovo ispitivanje primjenjuje se za otkrivanje kromosomskih aberacija koje mogu nastati kao posljedica klastogenih događaja. Analizu nastanka kromosomskih aberacija trebalo bi provesti koristeći se stanicama u metafazi. Stoga je bitno da stanice dosegnu mitozu u tretiranim i netretiranim kulturama. U slučaju proizvedenih nanomaterijala mogu biti potrebne posebne prilagodbe ove ispitne metode, ali one nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

▼M7

NAČELO ISPITIVANJA

Stanične kulture ljudskog podrijetla ili dobivene od drugih sisavaca izlažu se ispitivanoj kemikaliji s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega, osim ako se upotrebljavaju stanice s odgovarajućim metaboličkim djelovanjem (vidjeti stavak 13.). U prikladnim, unaprijed određenim intervalima nakon početka izlaganja staničnih kultura ispitivanoj kemikaliji stanične kulture tretiraju se kemikalijom za zaustavljanje metafaze (npr. kolcemidom ili kolhicinom), izdvajaju se stanice, boje se te se mikroskopskom analizom metafaznih stanica utvrđuje prisutnost aberacija kromatidnog i kromosomskog tipa.

OPIS METODE

Preparati

Stanice

Mogu se primjenjivati različite stanične linije (npr. jajnik kineskog hrčka(CHO), pluća kineskog hrčka V79, pluća kineskog hrčka (CHL)/IU, TK6) ili primarne stanične kulture, uključujući limfocite periferne krvi čovjeka ili drugih sisavaca (7.). Odabir upotrijebljenih staničnih linija trebalo bi znanstveno opravdati. Kada se primjenjuju primarne stanice, radi dobrobiti životinja trebalo bi, ako je to izvedivo, razmotriti uporabu primarnih stanica ljudskog podrijetla, a uzorke bi trebalo uzeti u skladu s ljudskim etičkim načelima i propisima. Ljudske limfocite periferne krvi trebalo bi uzeti od mladih (približna dob od 18 do 35 godina) nepušača koji prema raspoloživim informacijama ne boluju ni od kakvih bolesti i nisu nedavno bili izloženi genotoksičnim agensima (npr. kemikalijama, ionizirajućem zračenju) pri razinama koje uzrokuju povećanje osnovne pojavnosti kromosomskih aberacija. Time bi se osigurala niska i dosljedna osnovna pojavnost kromosomskih aberacija. Osnovna pojavnost kromosomskih aberacija povećava se s dobi, pri čemu je taj trend izraženiji kod ženki nego kod mužjaka (17. i 18.). Ako su za uporabu objedinjene stanice više od jednog donora, trebalo bi navesti broj donora. Potrebno je dokazati da je u razdoblju od početka tretiranja ispitivanom kemikalijom do uzorkovanja stanica došlo do diobe stanica. Stanične kulture održavaju se u fazi eksponencijalnog rasta stanica (stanične linije) ili se stimuliraju na diobu (primarne kulture limfocita) kako bi se osigurala izloženost stanica u različitim stadijima staničnog ciklusa jer možda nije poznata osjetljivost stadija stanice na ispitivanu kemikaliju. Primarne stanice koje je potrebno mitogenima potaknuti na diobu obično nisu više sinkronizirane tijekom izloženosti ispitivanoj kemikaliji (npr. ljudski limfociti nakon mitogenske stimulacije u trajanju od 48 sati). Uporaba sinkroniziranih stanica tijekom tretiranja nije preporučljiva, ali može biti prihvatljiva, ako je opravdana.

Uvjeti koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

Za održavanje kultura trebalo bi primjenjivati prikladne uvjete za hranjive podloge za uzgoj kultura i uvjete inkubacije (posude za kulture, prema potrebi vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO_2, temperaturu inkubacije od 37 °C). Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broj kromosoma staničnih linija te odsutnost mikoplazmatske kontaminacije (7. i 19.), a stanice ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je promijenjen modalni broj kromosoma. Trebalo bi utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa staničnih linija ili primarnih kultura upotrijebljenih u ispitnom laboratoriju i ono bi trebalo biti usklađeno s objavljenim svojstvima stanica (20).

Priprema kultura

Stanične linije: stanice se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju na hranjivu podlogu za uzgoj kulture takvom gustoćom da stanice u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi nastave eksponencijalno rasti do trenutka izdvajanja (npr. treba izbjegavati konfluenciju kod stanica koje rastu kao jednoslojna kultura).

▼M7

Limfociti: cjelokupna krv tretirana antikoagulansom (npr. heparinom) ili izdvojeni limfociti uzgajaju se (npr. 48 sati za ljudske limfocite) u prisutnosti mitogena (npr. fitohemaglutinina (PHA) za ljudske limfocite) kako bi se izazvala dioba stanica prije izlaganja ispitivanoj kemikaliji.

Metabolička aktivacija

Kod uporabe stanica s neodgovarajućom endogenom sposobnošću metabolizma trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena iz jetra glodavaca (općenito štakora), koja je bila tretirana sredstvima za enzimsku indukciju, kao što je Aroclor 1254 (21., 22. i 23.), ili mješavinom fenobarbitona i β-naftoflavona (24., 25., 26., 27., 28. i 29.). Potonja smjesa nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (30.) i dokazano je da je za nastanak oksidaza s miješanom funkcijom jednako učinkovita kao Aroclor 1254 (24., 25., 26. i 28.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 % (v/v), ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Tijekom tretiranja trebalo bi izbjegavati uporabu proizvoda kojima se smanjuje mitotski indeks, posebno proizvoda s kompleksom kalcija (31.). Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija kemikalija koje se ispituju.

Priprema ispitivane kemikalije

Prije tretiranja stanica krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti (vidjeti stavak 23.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (32., 33. i 34.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

Ispitni uvjeti

Otapala

Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivanih kemikalija bez negativnih učinaka na provedbu testa, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili hranjive podloge za uzgoj kulture). Dobro provjerena su otapala, na primjer, voda ili dimetil sulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), dok vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u konačnom mediju za tretiranje. Ako se upotrebljavaju otapala koja nisu dobro provjerena (npr. etanol ili aceton), njihovu uporabu trebalo bi poduprijeti podacima u kojima su navedeni njihova kompatibilnost s ispitivanim kemikalijama, sustav ispitivanja i izostanak genetske toksičnosti u koncentraciji koja se upotrebljava. Ako ne postoje takvi popratni podaci, važno je uključiti netretirane kulture (vidjeti Dodatak 1.) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo nema štetne ili klastogene učinke.

Mjerenje proliferacije stanica i citotoksičnosti te odabir ispitnih koncentracija

Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažnih pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 22.), taloženje u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture (vidjeti stavak 23.) i značajne promjene pH vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 5.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje značajnu promjenu pH-vrijednosti hranjive

▼M7

podloge, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem konačnog medija za tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti uzgoja kulture.

Proliferacija stanica mjeri se kako bi se osiguralo da je u dovoljnom broju tretiranih stanica tijekom ispitivanja došlo do mitoze i da se stanice tretiraju pri prikladnim razinama citotoksičnosti (vidjeti stavke 18. i 22.). Citotoksičnost bi trebalo utvrditi s metaboličkom aktivacijom i bez nje u glavnom pokusu uz uporabu prikladnih pokazatelja smrti i rasta stanica. Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije obvezno. Ako se provede, njime se ne bi trebalo zamijeniti mjerenje citotoksičnosti u glavnom pokusu.

Relativno udvostručenje populacije (RPD) ili relativno povećanje broja stanica (RICC) prikladne su metode za ocjenu citotoksičnosti u citogenetskim ispitivanjima (13., 15., 35., 36. i 55.) (formule vidjeti u Dodatku 2.). U slučaju dugotrajnih tretiranja i vremena uzorkovanja koja od početka tretiranja traju dulje od 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa (npr. dulje od tri stanična ciklusa ukupno), u okviru RPD-a citotoksičnost može biti podcijenjena (37.). U tim okolnostima RICC može biti bolja mjera ili bi ocjena citotoksičnosti nakon 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa bila korisna procjena uz primjenu RPD-a.

Iako je za limfocite u primarnim kulturama mitotski indeks mjerilo citotoksičnih/citostatskih učinaka, na njega utječu vrijeme u koje je izmjeren nakon tretiranja, upotrijebljeni mitogen i mogući poremećaj staničnog ciklusa. Međutim, mitotski je indeks prihvatljiv jer druga mjerenja citotoksičnosti mogu biti komplicirana i nepraktična i ne mogu se primjenjivati na ciljanu populaciju limfocita koji rastu kao odgovor na stimulaciju fitohemaglutininom (PHA).

Iako su RICC i RPD za stanične linije i mitotski indeks za primarne kulture limfocita preporučeni parametri citotoksičnosti, drugim pokazateljima (kao što su npr. integritet stanica, apoptoza, nekroza, stanični ciklus) mogu se pružiti korisne dodatne informacije.

Potrebno je ocijeniti najmanje tri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjuju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Neovisno o vrsti stanica (stanične linije ili primarne kulture limfocita), za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Iako se preporučuje upotreba dviju identičnih kultura, prihvatljiva je i upotreba jedne kulture pod uvjetom da se pregleda jednak ukupni broj stanica neovisno o tome je li riječ o jednoj kulturi ili dvjema identičnim kulturama. Uporaba jedne kulture posebno je relevantna ako se ocjenjuje više od tri koncentracije (vidjeti stavak 31.). Rezultati dobiveni iz više neovisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji mogu se objediniti radi analize podataka (38.). Za ispitivane kemikalije za koje je dokazana mala citotoksičnost ili nepostojanje citotoksičnosti uobičajeno će biti prikladne koncentracije u dva do tri intervala. U slučaju pojave citotoksičnosti, odabranim ispitnim koncentracijama trebao bi

▼M7

biti obuhvaćen raspon od koncentracije pri kojoj se pojavljuje citotoksičnost kako je opisano u stavku 22. do koncentracija pri kojima je citotoksičnost umjerena, niska ili nepostojeća. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za dobivanje podataka pri niskoj ili umjerenoj citotoksičnosti ili za detaljno istraživanje odnosa između doze i odgovora biti potrebno upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i/ili više od tri koncentracije (za jednu ili ponovljene kulture), posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 47.).

Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvišom koncentracijom trebalo bi nastojati ostvariti citotoksičnost od 55 ± 5 % uz primjenu preporučenih parametara citotoksičnosti (odnosno smanjenja RICC-a i RPD-a za stanične linije i smanjenja mitotskog indeksa za primarne kulture limfocita na 45 ± 5 % istodobne negativne kontrole). Trebalo bi voditi računa o tumačenju pozitivnih rezultata koji se mogu utvrditi samo u gornjem dijelu tog raspona citotoksičnosti od 55 ± 5 % (13.).

Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva, najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenja ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utječe na izvođenje testa (npr. bojenje ili brojenje). Može biti korisno odrediti topljivost u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.

Ako nisu zapaženi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (39., 40. i 41.). Ako nije utvrđen sastav ispitivane kemikalije, npr. ako je ona tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB) (42.), uzorak iz okoliša itd., najviša koncentracija možda će morati biti viša (npr. 5 mg/ml) u slučaju izostanka dostatne citotoksičnosti kako bi se povećala koncentracija svake komponente. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (43.).

Kontrole

Kod svakog izdvajanja stanica trebalo bi uključiti istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 15.) koje se sastoje samo od otapala u hranjivoj podlozi i koje su tretirane jednako kao i kulture.

Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje klastogena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja i učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije ako je to primjenjivo. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se upotrebljavati alternativne kemikalije pozitivne kontrole. Budući da su *in vitro* ispitivanja stanica sisavaca na genetsku toksičnost u dovoljnoj mjeri standardizirana, uporaba pozitivnih kontrola može biti ograničena na klastogen koji zahtijeva metaboličku aktivaciju. Pod uvjetom da se provodi paralelno s neaktiviranim ispitivanjem uz primjenu jednakog trajanja tretiranja, jednim odgovorom pozitivne kontrole dokazat će se aktivnost sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost sustava ispitivanja. Međutim, dugotrajno tretiranje (bez S9) trebalo bi imati svoju pozitivnu kontrolu jer će se trajanje tretiranja razlikovati od ispitivanja u kojem se primjenjuje metabolička aktivacija. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava (tj. učinci su jasni, ali identitet kodiranih predmetnih stakalaca nije odmah očit osobi koja očitava rezultate), a odgovor ne bi trebalo dovesti u pitanje citotoksičnošću koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ispitnoj metodi.

▼M7

Tablica 1.

Referentne kemikalije preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za odabir pozitivnih kontrola.

Kategorija	Kemikalija	CAS br.
1. Klastogeni aktivni bez metaboličke aktivacije		
	Metil metansulfonat	66-27-3
	Mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oksid	56-57-5
	Citozin arabinozid	147-94-4
2. Klastogeni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciklofosfamid	50-18-0

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisutnost i odsutnost sustava metaboličke aktivacije.

Vrijeme izdvajanja stanica iz kulture

Za temeljito ocjenjivanje, koje će biti potrebno za donošenje zaključka o negativnom ishodu, trebalo bi provesti sva tri sljedeća pokusna uvjeta uz primjenu kratkotrajnog tretiranja s metaboličkom aktivacijom i bez nje i dugotrajnog tretiranja bez metaboličke aktivacije (vidjeti stavke 43., 44. i 45.).

— Stanice bi trebalo tri sata do šest sati izlagati ispitivanoj kemikaliji bez metaboličke aktivacije i uzorkovati ih po isteku vremena koje odgovara vremenu približno 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa od početka tretiranja (18.).

— Stanice bi trebalo tri sata do šest sati izlagati ispitivanoj kemikaliji s metaboličkom aktivacijom i uzorkovati ih po isteku vremena koje odgovara vremenu približno 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa od početka tretiranja (18.).

— Stanice bi trebalo neprekidno izlagati bez metaboličke aktivacije do uzorkovanja po isteku vremena koje odgovara vremenu približno 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa. Određene kemikalije (npr. nukleozidne analoge) lakše je otkriti ako je vrijeme tretiranja/uzorkovanja dulje od 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa (24.).

Ako bilo koji od gore navedenih pokusnih uvjeta dovede to pozitivnog odgovora, možda neće biti potrebno istražiti ni jedan drugi postupak tretiranja.

Priprema kromosoma

Stanične kulture tretiraju se kolcemidom ili kolhicinom obično jedan sat do tri sata prije izdvajanja stanica. Stanice za pripremu kromosoma izdvajaju se i obrađuju iz svake stanične kulture zasebno. Priprema kromosoma uključuje hipotoničko tretiranje stanica, fiksiranje i bojenje. U slučaju jednog sloja, na kraju tretiranja u trajanju od tri sata do šest sati mogu biti prisutne mitotske stanice (prepoznatljive kao okrugle stanice koje se odvajaju od površine). Budući da se te mitotske stanice lako odvajaju, mogu se izgubiti pri odstranjivanju podloge s

▼M7

ispitivanom kemikalijom. Ako postoji dokaz o znatnom povećanju broja mitotskih stanica u odnosu na kontrole, čime se ukazuje na vjerojatno zaustavljanje mitoze, te stanice trebalo bi prikupiti centrifugiranjem i ponovno dodati kulturama kako bi se u trenutku izdvajanja stanica izbjegao gubitak stanica koje se nalaze u fazi mitoze i koje su u opasnosti od kromosomskih aberacija.

Analiza

Sva predmetna stakalca, uključujući i stakalca pozitivnih i negativnih kontrola, trebalo bi prije mikroskopske analize radi utvrđivanja kromosomskih aberacija nezavisno kodirati. Budući da postupak fiksiranja često za posljedicu ima određeni udio metafaznih stanica koje su izgubile kromosome, stanice koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržavati broj centromera jednak modalnom broju +/– 2.

Za svaku koncentraciju i kontrolu trebalo bi pregledati najmanje 300 dobro vidljivih metafaza kako bi se zaključilo da je ispitivana kemikalija jasno negativna (vidjeti stavak 45.). Ako se upotrebljavaju ponovljene kulture, 300 stanica trebalo bi jednakomjerno raspodijeliti među ponovljenim kulturama. Ako se upotrebljava jedna kultura po koncentraciji (vidjeti stavak 21.), trebalo bi pregledati najmanje 300 dobro vidljivih metafaza u toj jednoj kulturi. Prednost vrednovanja 300 stanica jest povećanje statističke snage ispitivanja; osim toga, rijetko se zapažaju nulte vrijednosti (očekuje se da će iznositi samo 5 %) (44.). Broj metafaza koje se pregledavaju može se smanjiti ako se opazi veliki broj stanica s kromosomskim aberacijama i ako se ispitivana kemikalija smatra jasno pozitivnom.

Trebalo bi pregledati stanice sa strukturnim kromosomskim aberacijama uključujući i isključujući kromosomske prekide. Lomovi i prekidi definirani su u Dodatku 1. u skladu s (45. i 46.). Aberacije kromatidnog i kromosomskog tipa trebalo bi bilježiti odvojeno i klasificirati prema podtipovima (lomovi, zamjene). U postupcima koji se primjenjuju u laboratoriju trebalo bi osigurati da analizu kromosomskih aberacija provode dobro osposobljeni analitičari te da je, prema potrebi, pregledaju stručnjaci.

Iako je svrha ovog ispitivanja otkrivanje strukturnih kromosomskih aberacija, važno je zabilježiti učestalost poliploidije i endoreduplikacije u slučaju da se opaze te pojave. (Vidjeti stavak 2.)

Osposobljenost laboratorija

Kako bi se utvrdilo dostatno iskustvo u ispitivanju prije njegove uporabe za rutinsko ispitivanje, laboratorij bi trebao provesti niz pokusa s referentnim pozitivnim kemikalijama uz primjenu različitih mehanizama i različitih negativnih kontrola (uključujući uporabu različitih otapala/nosača). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. To se ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom prijašnjih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavka 37.

Odabir kemikalija pozitivnih kontrola (vidjeti tablicu 1. iz stavka 26.) trebalo bi istražiti primjenom kratkotrajnih i dugotrajnih tretiranja bez metaboličke aktivacije, kao i primjenom kratkotrajnog tretiranja s metaboličkom aktivacijom kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje klastogenih kemikalija i utvrdila učinkovitost sustava metaboličke aktivacije. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih kemikalija pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

▼M7

Podaci o prijašnjim kontrolama

Laboratorij bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).

Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama, ako oni postoje. Nakon što se distribuciji kontrola doda još podataka o pokusima, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (44. i 47.). Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, međutim bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami 48.), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama i dokazali da je u njihovom laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (44.). Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati ranije podatke (npr. kriterije za uključivanje podataka u ranije podatke i za isključivanje iz njih i kriterije prihvatljivosti za određeni pokus) nalaze se u literaturi (47.).

Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o pojavnosti stanica s kromosomskim aberacijama iz jedne kulture ili zbroja ponovljenih kultura kako je opisano u stavku 21. Istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica od 95 % za distribuciju baze podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (44. i 47.). Ako su podaci o istodobnim negativnim kontrolama izvan kontrolnih granica od 95 %, njihovo je uključivanje u distribuciju prijašnjih kontrola prihvatljivo sve dok ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti i ako postoje dokazi o tome da je sustav ispitivanja „pod kontrolom” (vidjeti stavak 37.) i dokazi o nepostojanju tehničke ili ljudske pogreške.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

Trebalo bi ocijeniti postotak stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama. Aberacije kromatidnog i kromosomskog tipa, klasificirane prema podtipovima (lomovi, zamjene), trebalo bi navesti odvojeno s njihovim brojem i učestalošću za pokusne i kontrolne kulture. Kromosomski prekidi bilježe se i navode u izvješću odvojeno, ali se ne uključuju u ukupnu učestalost aberacija. Postotak poliploidnih i/ili endoreduplicianih stanica bilježi se ako su zapažene takve stanice.

Trebalo bi zabilježiti i rezultate istodobnog mjerenja citotoksičnosti za sve tretirane, negativne i pozitivne kontrolne kulture u glavnim pokusima za dokazivanje aberacija.

Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tablice.

Kriteriji prihvatljivosti

Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:

— smatra se da je istodobnu negativnu kontrolu prihvatljivo dodati u bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija kako je opisano u stavku 39.,

▼M7

— istodobnim pozitivnim kontrolama (vidjeti stavak 26.) trebalo bi izazvati odgovore koji su u skladu s onima generiranima u bazi povijesnih podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— trebalo bi ispuniti kriterije proliferacije stanica u kontroli s otapalom (stavci 17. i 18.),

— ispitana su sva tri pokusna uvjeta, osim ako je jedan za posljedicu imao pozitivne rezultate (vidjeti stavak 28.),

— odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 31. i 21.),

— kriteriji za odabir najviše koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 22., 23. i 24.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta (vidjeti stavak 28.):

a) najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b) odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s dozom;

c) bilo koji od rezultata nije uključen u distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolnih granica od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 39.).

Kada su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može izazvati kromosomske aberacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (49., 50. i 51.).

Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 28.):

a) ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b) odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom;

c) svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolnih granica od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 39.).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može izazvati kromosomske aberacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja.

Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je opisano gore ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Vrednovanje dodatnih stanica (ako je to prikladno) ili ponavljanje pokusa uz moguću primjenu izmijenjenih pokusnih uvjeta (npr. rasporeda koncentracija, ostalih uvjeta metaboličke aktivacije (npr. S9 koncentracije ili S9 podrijetla)) mogu biti korisni.

U rijetkim slučajevima, čak i nakon daljnjih istraživanja, neće biti moguće na temelju dobivenih podataka donijeti zaključak o pozitivnim ili negativnim rezultatima, te će se stoga zaključiti da je odgovor na ispitivanu kemikaliju dvosmislen.

▼M7

Povećanje broja poliploidnih stanica može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati mitotske procese i izazvati numeričke kromosomske aberacije (52.). Povećanje broja stanica s endoredupliciranim kromosomima može značiti da ispitivana kemikalije može inhibirati progresiju staničnog ciklusa (53. i 54.) (vidjeti stavak 2.). Stoga bi pojavnost poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima trebalo bilježiti odvojeno.

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu ako su poznate,

— ako je to potrebno, mjerenja pH vrijednosti, osmolalnosti i taloga u hranjivoj podlozi za uzgoj kultura kojoj je dodana ispitivana kemikalija.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

— opisane koliko god je to moguće kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka.

Otapalo:

— opravdanost izbora otapala,

— trebalo bi navesti i postotak otapala u konačnoj hranjivoj podlozi za uzgoj kultura.

Stanice:

— vrsta i izvor stanica,

— kariotipna svojstva i prikladnost upotrijebljene vrste stanica,

— nepostojanje mikoplazme u slučaju staničnih linija,

— za stanične linije, informacije o trajanju staničnog ciklusa, vremenu udvostručavanja ili indeksu proliferacije,

— spol donora krvi, dob donora i sve relevantne informacije o donoru, puna krv ili izdvojeni limfociti, upotrijebljeni mitogen,

— ako je dostupan, broj prolaza za stanične linije,

— metode održavanja staničnih kultura za stanične linije,

— modalni broj kromosoma za stanične linije.

▼**M7**

Ispitni uvjeti:

— identitet kemikalije za zaustavljanje metafaze, njezina koncentracija i trajanje izlaganja stanica,

— koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u hranjivoj podlozi za uzgoj kultura (npr. µg ili mg/mL ili mM podloge za uzgoj kultura),

— obrazloženje za odabir koncentracija i broja kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti i granice topljivosti,

— sastav podloge, koncentracija CO_2 ako je to primjenjivo, razina vlažnosti,

— koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani hranjivoj podlozi za uzgoj kultura,

— temperatura inkubacije,

— vrijeme inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— izdvajanje nakon tretiranja,

— gustoća stanica kod nasađivanja, ako je to primjenjivo,

— vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme S9 smjese, koncentracija ili volumen S9 smjese i S9 u konačnoj hranjivoj podlozi za uzgoj kultura, kontrole kvalitete S9),

— kemikalije pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije za svaki od uvjeta tretiranja,

— metode pripreme predmetnih stakalaca i upotrijebljene tehnike bojenja,

— kriteriji prihvatljivosti analiza,

— kriteriji vrednovanja aberacija,

— broj analiziranih metafaza,

— metode mjerenja citotoksičnosti,

— sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,

— kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,

— metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

— broj tretiranih stanica i broj izdvojenih stanica za svaku kulturu ako se upotrebljavaju stanične linije,

— mjerenja citotoksičnosti, npr. RPD, RICC, mitotski indeks, druga potencijalna zapažanja,

— informacije o trajanju staničnog ciklusa, vremenu udvostručavanja ili indeksu proliferacije u slučaju staničnih linija,

— znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,

▼M7

— definicija aberacija, uključujući kromosomske prekide,

— broj pregledanih stanica, broj stanica s kromosomskim aberacijama i tip kromosomskih aberacija navedeni odvojeno za svaku tretiranu i kontrolnu kulturu, uključujući i isključujući prekide,

— promjene ploidije (poliploidne stanice i stanice s endoreduplicirani kromosomima navedene odvojeno), ako je zapažena,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),

— podaci o prijašnjim negativnim (otapalo) i pozitivnim kontrolama s rasponima, srednjim izmjerenim vrijednostima i standardnim odstupanjima te kontrolnim granicama od 95 % za distribuciju, kao i broj podataka,

— statističke analize, potencijalne p-vrijednosti.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

LITERATURA

1. OECD (2016). Pregled skupa smjernica OECD-a za ispitivanje u području genetske toksikologije te ažuriranja iz 2014. i 2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2. Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", u *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, str. 1. – 29.

3. Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" u *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam – New York – Oxford, str. 427. – 432.

4. Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, str. 1. – 175.

5. Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, str. 318. – 327.

6. Poglavlje B.49. ovog Priloga: *In vitro mikronukleus-test na stanicama sisavaca.*

7. ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

8. Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 257/2, str. 147. – 204.

9. Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, str. 297. – 305.

10. Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, str. 789. – 886.

▼**M7**

11. Long, L.H. *et al*. (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, str. 177. – 183.

12. Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, str. 439. – 452.

13. Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, str. 191. – 201.

14. Kirkland, D. *et al*. (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, str. 1. – 256.

15. Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, str. 36. – 44.

16. Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, str. 316. – 326.

17. Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, str. 305. – 309.

18. Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, str. 95. – 106.

19. Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, str. 261. – 287.

20. Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, str. 163. – 167.

21. Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, str. 347. – 363.

22. Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, str. 173. – 215.

23. Natarajan, A.T. *et al*. (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 Research*, Vol. 37/1, str. 83. – 90.

24. Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, str. 277. – 290.

25. 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, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, str. 55. – 65.

26. Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, str. 175. – 177.

▼**M7**

27. Matsushima, T. *et al*. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", u *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, str. 85. – 88.

28. Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, str. 241. – 261.

29. Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, str. 51. – 59.

30. UNEP (2001), Stockholmska konvencija o postojanim organskim onečišćujućim tvarima, Program Ujedinjenih naroda za zaštitu okoliša (UNEP). Dostupno na: http://www.pops.int/.

31. Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, str. 225. – 8.

32. Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", u *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, str. 91. – 103.

33. Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, str. 795. – 801.

34. Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, str. 122. – 130.

35. Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, str. 1. – 3.

36. Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, str. 77. – 83.

37. Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, str. 86. – 87.

38. Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, str. 141. – 154.

39. OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Dostupno na zahtjev.

40. Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, str. 32. – 56.

41. Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 54/1, str. 36. – 43.

▼**M7**

42. EPA, Ured za kemijsku sigurnost i sprječavanje onečišćenja (2011), Kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijal: UVCB tvari, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

43. USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupno na: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

44. OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)", Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

45. ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

46. Scott, D. *et al*. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", u *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 62. – 86.

47. Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, str. 87. – 90.

48. Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

49. Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

50. Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, str. 1. – 175.

51. Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", u *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 141. – 154.

52. Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, str. 29. – 46.

53. Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, str. 403. – 413.

54. Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, str. 1362. – 1364.

55. Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, str. 139. – 149.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne u cijeloj skupini ili skupinama kromosoma (poliploidija).

Apoptoza: programirana smrt stanice koju obilježava niz koraka koji vode do razgradnje stanica u čestice vezane na membranu koje se potom eliminiraju fagocitozom ili rasipanjem.

Proliferacija stanica: povećanje broja stanica kao posljedica mitotske diobe stanice.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Kromatidni lom: prestanak pojedinačne kromatide u kojoj postoji jasan otklon jedne od kromatida.

Kromatidni prekid: neobojeno područje (akromatska lezija) jedne kromatide u kojoj postoji minimalan otklon kromatide.

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

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

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

Koncentracije: odnosi se na konačne koncentracije ispitivane kemikalije u hranjivoj podlozi za uzgoj kultura.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom u kojima se upotrebljavaju stanične linije citotoksičnost je utvrđena kao smanjenje relativnog udvostručenja populacije (RPD) ili relativnog povećanja broja stanica (RICC) tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti stavak 17. i Dodatak 2.). Za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom u kojima se upotrebljavaju primarne kulture limfocita citotoksičnost je utvrđena kao smanjenje mitotskog indeksa tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti stavak 18. i Dodatak 2.).

Endoreduplikacija: proces kod kojeg nakon S-faze replikacije DNK ne slijedi mitoza jezgre, nego započinje druga S-faza. Rezultat su kromosomi s 4, 8, 16... kromatida.

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

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

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

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

▼M7

Numerička aberacija: promjena broja kromosoma u odnosu na uobičajeni broj svojstven upotrijebljenim stanicama.

Poliploidija: numeričke aberacije kromosoma u stanicama ili organizmima koje zahvaćaju cijeli skup kromosoma, a ne jedan ili više pojedinačnih kromosoma (aneuploidija).

Status proteina p53: protein p53 sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi i popravku DNK. Stanice kojima nedostaje funkcionalan protein p53, koje nisu u mogućnosti zaustaviti stanični ciklus ili ukloniti oštećene stanice putem apoptoze ili drugih mehanizama (npr. indukcijom popravka DNK) povezanih s funkcijama proteina p53 kao odgovorima na oštećenje DNK, teoretski bi trebale biti podložnije genskim mutacijama ili kromosomskim aberacijama.

Relativno povećanje broja stanica (RICC): povećanje broja stanica u kulturama izloženima kemikaliji u odnosu na povećanje u netretiranim kulturama, omjer izražen kao postotak.

Relativno udvostručenje populacije (RPD): povećanje broja udvostručenja populacije u kulturama izloženima kemikaliji u odnosu na povećanje u netretiranim kulturama, omjer izražen kao postotak.

Frakcija jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. sirovi ekstrakt jetre.

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

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

Strukturna aberacija: promjena u strukturi kromosoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom diobe stanica u metafazi, zapažena kao brisanja ili fragmenti, intrakromosomske promjene ili interkromosomske promjene.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Netretirane kulture: kulture koje nisu ničim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju istodobno i na isti način kao i kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

▼M7

Dodatak 2.

FORMULE ZA OCJENJIVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Mitotski indeks:

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Broj mitotskih stanica}}{\text{Ukupni broj pregledanih stanica}} \times 100$$

Preporučuju se **relativno povećanje broja stanica (RICC)** ili **relativno udvostručenje populacije (RPD)** budući da se u obje metode u obzir uzima udio populacije stanica koje su se podijelile.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Povećanje broja stanica u tretiranim kulturama(konačan-početni)})}{(\text{Povećanje broja stanica u kontrolnim kulturama(konačan-početni)})} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Broj udvostručenja populacije u tretiranim kulturama})}{(\text{Broj udvostručenja populacije u kontrolnim kulturama})} \times 100$$

pri čemu je:

udvostručenje populacije = [log (broj stanica nakon tretiranja ÷ početni broj stanica)] ÷ log 2

Na primjer, RICC ili RPD od 53 % ukazuje na citotoksičnost/citostazu od 47 %, dok citotoksičnost/citostaza od 55 %, mjerena mitotskim indeksom, znači da je stvarni mitotski indeks 45 % kontrole.

U svakom slučaju, trebalo bi mjeriti broj stanica prije tretiranja jednako za tretirane i negativne kontrolne kulture.

Iako se RCC (odnosno broj stranica u tretiranim kulturama / broj stanica u kontrolnim kulturama) u prošlosti upotrebljavao kao parametar citotoksičnosti, on se više ne preporučuje jer kod te metode citotoksičnost može biti podcijenjena.

U negativnim kontrolnim kulturama udvostručenje populacije trebalo bi biti u skladu sa zahtjevom uzrokovanja stanica poslije tretiranja po isteku vremena koje odgovara trajanju približno 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa i mitotski bi indeks trebao biti dovoljno visok za dobivanje dostatnog broja stanica u mitozi i pouzdano izračunavanje smanjenja od 50 %.

▼M7

B.11. ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U KOŠTANOJ SRŽI SISAVACA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 475 (2016.). Dio je serije metoda za ispitivanje genetske toksikologije. Razvijen je i dokument OECD-a u kojemu se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena tih ispitnih smjernica (1).

In vivo ispitivanje kromosomskih aberacija u koštanoj srži sisavaca posebno je relevantno za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori metabolizma, farmakokinetike i procesa popravka DNK *in vivo*aktivni su i pridonose odgovorima. *In vivo* test koristan je i za daljnje istraživanje genotoksičnosti otkrivene nekim *in vitro* sustavom.

In vivo ispitivanje kromosomskih aberacija sisavaca primjenjuje se za otkrivanje strukturnih kromosomskih aberacija u stanicama koštane srži životinja, obično glodavaca, uzrokovanih ispitivanim kemikalijama (2., 3., 4. i 5.). Razlikujemo dva tipa strukturnih kromosomskih aberacija: kromosomski i kromatidni. Iako je većina aberacija izazvanih genotoksičnim kemikalijama kromatidnog tipa, pojavljuju se i aberacije kromosomskog tipa. Oštećenja kromosoma i srodne pojave uzrok su mnogih genetskih oboljenja ljudi i postoje dostatni dokazi da su te lezije i srodne pojave koje uzrokuju promjene u onkogenima i genima supresorima tumora povezane s pojavom raka kod ljudi i u pokusnim sustavima. Tijekom *in vivo* testova kromosomskih aberacija može doći do pojave poliploidije (uključujući endoreduplikaciju). Međutim, povećanje poliploidije samo po sebi nije pokazatelj aneugenog potencijala, već može jednostavno biti pokazatelj poremećaja staničnog ciklusa ili citotoksičnosti. Ovo ispitivanje nije namijenjeno mjerenju aneuploidije. *In vivo* mikronukleus-test na eritrocitima sisavaca (poglavlje B.12. ovog Priloga) ili *in vitro* mikronukleus-test na stanicama sisavaca (poglavlje B.49. ovog Priloga) bila bi *in vivo* i *in vitro* ispitivanja preporučena za otkrivanje aneuploidije.

Upotrijebljene definicije terminologije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

U tom ispitivanju uobičajeno se upotrebljavaju glodavci, ali i druge vrste mogu biti prikladne u određenim slučajevima, ako je to znanstveno opravdano. Ciljno tkivo u tom ispitivanju jest koštana srž jer je jako prokrvljena i sadržava populaciju stanica čiji se ciklus odvija brzo i koje se mogu lako izolirati i obrađivati. U izvješću bi trebalo navesti znanstveno opravdanje za uporabu drugih vrsta osim štakora i miševa. Ako se upotrebljavaju druge vrste osim glodavaca, preporučuje se uvrštavanje mjerenja kromosomske aberacije u koštanoj srži u drugo prikladno ispitivanje toksičnosti.

Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezin metabolit neće dospjeti do ciljnog tkiva, ovaj oblik ispitivanja možda nije prikladan.

Prije nego što se ta ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

▼M7

NAČELO ISPITNE METODE

Životinje se izlažu ispitivanoj kemikaliji prikladnim načinom izlaganja i humano eutanaziraju u prikladnom trenutku nakon tretiranja. Prije eutanazije životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili kolcemidom). Nakon toga se pripremaju i boje kromosomski preparati stanica koštane srži te se analizom utvrđuju kromosomske aberacije metafaznih stanica.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Istraživanja osposobljenosti

Kako bi se utvrdilo dostatno iskustvo u provedbi testa prije njegove uporabe za rutinsko ispitivanje, laboratorij bi trebao dokazati sposobnost dobivanja očekivanih rezultata na temelju objavljenih podataka (npr. 6.) za učestalost kromosomskih aberacija s najmanje dvije kemikalije pozitivnih kontrola (uključujući slabe odgovore izazvane niskom dozom pozitivnih kontrola), kao što su one navedene u tablici 1., i s kompatibilnim kontrolama s nosačem/otapalom (vidjeti stavak 22.). U tim pokusima trebalo bi upotrebljavati doze na temelju kojih se dobivaju ponovljiva povećanja koja se odnose na dozu i dokazuju osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava u pogledu ciljnog tkiva (koštane srži) uz uporabu metode vrednovanja koja će se upotrebljavati u laboratoriju. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom ranijih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavaka od 10. do 14.

Podaci o prijašnjim kontrolama

Tijekom istraživanja osposobljenosti laboratorij bi treba utvrditi:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola te

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola.

Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama, ako oni postoje. Nakon što se distribuciji prijašnjih kontrola doda još podataka o pokusima, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica te distribucije od 95 %. Baza podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama trebala bi biti statistički čvrsta kako bi se osigurala sposobnost laboratorija za ocjenjivanje distribucije podataka o negativnim kontrolama. U literaturi je navedeno da može biti potrebno najmanje deset pokusa, ali bilo bi poželjno da podaci obuhvaćaju najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami (7.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci i dokazali da je u njihovom laboratoriju metodologija „pod kontrolom”. Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati ranije podatke (npr. kriterije za uključivanje podataka u ranije podatke i za isključivanje iz njih i kriterije prihvatljivosti za određeni pokus) nalaze se u literaturi (8.).

Ako laboratorij ne provede dovoljan broj pokusa za utvrđivanje statistički čvrste distribucije negativnih kontrola (vidjeti stavak 11.) tijekom istraživanja osposobljenosti (kako je opisano u stavku 9.), prihvatljiva je uspostava distribucije tijekom prvih rutinskih ispitivanja. Taj pristup trebao bi biti u skladu s preporukama iz literature (8.), a rezultati dobiveni negativnim kontrolama u tim pokusima trebali bi biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim kontrolama.

▼M7

Sve izmjene protokola pokusa trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li njihov učinak na dobivene podatke ostao u skladu s postojećom bazom podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Samo veće neusklađenosti trebale bi za posljedicu imati uspostavljanje nove baze podataka o prijašnjim kontrolama, pri čemu se na temelju stručne prosudbe utvrđuje da je riječ o razlici u odnosu na prijašnju distribuciju (vidjeti stavak 11.). Tijekom ponovnog uspostavljanja možda neće biti potrebna potpuna baza podataka o negativnim kontrolama za provedbu stvarnog ispitivanja pod uvjetom da laboratorij može dokazati da su vrijednosti istodobnih negativnih kontrola ostale u skladu s prijašnjom bazom podataka ili s odgovarajućim objavljenim podacima.

Podaci o negativnim kontrolama trebali bi uključivati pojavnost strukturnih kromosomskih aberacija (isključujući prekide) kod svake životinje. Istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica od 95 % za distribuciju baze podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama. Ako su podaci o istodobnim negativnim kontrolama izvan kontrolnih granica od 95 %, njihovo je uključivanje u distribuciju prijašnjih kontrola prihvatljivo sve dok ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti i ako postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 11.) i ako nema dokaza o tehničkoj ili ljudskoj pogrešci.

OPIS METODE

Preparati

Odabir životinjske vrste

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

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

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

Priprema životinja

Uobičajeno se upotrebljavaju zdrave mlade odrasle životinje (u slučaju glodavaca, u idealnim okolnostima životinje u dobi od šest do deset tjedana na početku tretiranja, iako su prihvatljive i nešto starije životinje) koje se nasumično određuju za kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje identificiraju se jedinstvenom humanom, najmanje invazivnom metodom (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem uha ili prsta) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku studije variranje tjelesne mase životinja trebalo bi biti što manje i ne bi trebalo prelaziti ±20 % odgovarajuće srednje vrijednosti mase svakog spola.

Priprema doza

Prije no što se doza da životinjama, krute ispitivane kemikalije trebalo bi otopiti ili suspendirati u prikladnim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Ako se unose inhaliranjem, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u

▼M7

obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Otapalo/nosač

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

Kontrole

Pozitivne kontrole

U svako ispitivanje trebalo bi uobičajeno uključiti skupinu životinja tretiranih kemikalijom pozitivne kontrole. Od toga se može odstupiti ako je ispitni laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja i uspostavio raspon prijašnjih pozitivnih kontrola. Ako nije uključena istodobna pozitivna kontrolna skupina, u svaki pokus trebalo bi uključiti kontrole vrednovanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca). Njih se može dobiti uključivanjem prikladnih referentnih uzoraka u vrednovanje istraživanja koji su dobiveni i pohranjeni iz zasebnog pokusa s pozitivnom kontrolom koji se provodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci) u laboratoriju u kojem se provodi ispitivanje, na primjer, tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovito nakon toga, ako je to potrebno.

Kemikalije pozitivnih kontrola trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama iznad spontane razine. Doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da učinci budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Prihvatljiva je drukčija primjena pozitivnih kontrola u odnosu na primjenu ispitivane kemikalije, uz uporabu drukčijeg rasporeda tretiranja, te provedba uzorkovanja u samo jednom trenutku. Osim toga, može se razmotriti uporaba kemikalija pozitivne kontrole koje pripadaju istoj kategoriji opasnosti kao i ispitivana kemikalija ako je to prikladno. Primjeri kemikalija pozitivne kontrole navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.

Primjeri kemikalija pozitivne kontrole

Kemikalija	CAS br.
Etil metansulfonat	62-50-0
Metil metansulfonat	66-27-3
Etil-nitrozourea	759-73-9
Mitomicin C	50-07-7
Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelamin	51-18-3

▼M7

Negativne kontrole

Životinje iz negativnih kontrolnih skupina trebalo bi uključiti kod svakog uzorkovanja te bi s njima trebalo postupati jednako kao i sa skupinama za tretiranje, uz izostanak tretiranja ispitivanom kemikalijom. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije upotrebljava nosač/otapalo, kontrolna skupina trebala bi dobiti taj nosač / to otapalo. Međutim, ako se podacima o prijašnjim negativnim kontrolama dokažu dosljedna varijabilnost među životinjama i učestalost stanica sa strukturnim aberacijama za svako vrijeme uzorkovanja za ispitni laboratorij, za negativnu kontrolu može biti potrebno samo jedno uzorkovanje. Ako se za negativne kontrole upotrebljava samo jedno uzorkovanje, to bi trebalo biti vrijeme prvog uzorkovanja u istraživanju.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

Općenito, odgovor mikronukleusa sličan je kod mužjaka i ženki (9.) te se očekuje da će to vrijediti i za strukturne kromosomske aberacije; stoga se većina istraživanja može provesti na bilo kojem spolu. Podacima kojima se dokazuju relevantne razlike između mužjaka i ženki (npr. razlike u sustavnoj toksičnosti, metabolizmu, bioraspoloživosti, toksičnosti za koštanu srž itd., uključujući npr. istraživanje o utvrđivanju raspona) potaknula bi se uporaba obaju spolova. U tom slučaju može biti prikladno provesti istraživanje na oba spola, npr. kao dio istraživanja toksičnosti nakon ponovljene doze. Ako se upotrebljavaju oba spola, bilo bi primjereno primijeniti faktorski model. U Dodatku 2. navedeni su detalji o načinu analize podataka primjenom tog plana.

Na početku istraživanja trebalo bi utvrditi veličine skupina kako bi se po skupini osiguralo minimalno pet životinja istog spola, ili svakog spola ako se upotrebljavaju oba spola, prikladnih za analizu. U slučajevima kad izloženost ljudi nekoj kemikaliji može biti vezana uz spol, kao što je slučaj s nekim farmaceutskim sredstvima, test bi trebalo obaviti na životinjama odgovarajućeg spola. Kao smjernica za maksimalne uobičajene zahtjeve u pogledu životinja, za istraživanje koštane srži s dva vremena uzorkovanja, tri skupine koje primaju dozu i istodobnom negativnom kontrolnom skupinom plus pozitivnom kontrolnom skupinom (pri čemu se svaka skupina sastoji od pet životinja istog spola) bilo bi potrebno 45 životinja.

Visine doza

Ako se provodi preliminarno istraživanje o utvrđivanju raspona jer nisu već na raspolaganju prikladni podaci kao pomoć u odabiru doza, ono bi se trebalo provesti u istom laboratoriju uz uporabu iste vrste, soja, spola i postupaka tretiranja kao i u glavnom istraživanju (10.). Cilj istraživanja trebalo bi biti utvrđivanje maksimalne doze tolerancije (MTD), koja je definirana kao najviša doza koja će se tolerirati bez dokaza o toksičnosti, povezane s ograničavanjem trajanja istraživanja (na primjer izazivanjem smanjenja tjelesne mase ili hematopoetske sustavne citotoksičnosti), isključujući smrt ili dokaze o boli, patnji ili stresu zbog kojih se zahtijeva humana eutanazija (11.).

Najviša doza može biti definirana i kao doza koja izaziva određenu toksičnost za koštanu srž.

Kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava ili koje izazivaju postupke detoksifikacije koji mogu dovesti do smanjene izloženosti nakon dugotrajnog tretiranja mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebalo bi ih ocijeniti od slučaja do slučaja.

Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako

▼M7

ispitivana kemikalija u istraživanju o utvrđivanju raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Ako je toksičnost ciljnog tkiva (koštane srži) zapažena pri svim ispitanim razinama doza, preporučuje se daljnje istraživanje pri netoksičnim dozama. Za istraživanja čiji je cilj potpunije opisati kvantitativne informacije o odgovoru na dozu mogu biti potrebne dodatne skupine koje primaju dozu. Za određene vrste ispitivanih kemikalija (npr. za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima) obuhvaćene posebnim zahtjevima ta se ograničenja mogu razlikovati.

Granično ispitivanje

Ako se pokusima o utvrđivanju raspona doze ili postojećim podacima o srodnim sojevima životinja dokaže da se načinom tretiranja koji uključuje najmanje graničnu dozu (opisanu u nastavku) ne uzrokuju vidljivi toksični učinci (uključujući izostanak smanjenja proliferacije koštane srži ili druge dokaze o citotoksičnosti za ciljno tkivo) i ako se genotoksičnost ne očekuje na temelju *in vitro* istraživanja genotoksičnosti ili podataka o strukturno srodnim kemikalijama, potpuno istraživanje uz primjenu tri razine doza ne smatra se potrebnim, pod uvjetom da je dokazano da su ispitivane kemikalije dospjele do ciljnog tkiva (koštane srži). U takvim slučajevima može biti dovoljna jedna razina doze pri graničnoj dozi. Za razdoblje primjene > 14 dana granična je doza 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno. Za razdoblje primjene od 14 dana ili manje granična je doza 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način ljudske izloženosti. Stoga se, ako su opravdani, mogu izabrati putovi primjene poput unosa hranom, vodom za piće, lokalnom primjenom, potkožno, intravenozno, oralno (intubacijom), udisanjem, intratrahealno ili implantacijom. U svakom slučaju, način izlaganja trebalo bi odabrati tako da se osigura prikladno izlaganje ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija općenito se ne preporučuje jer nije način izlaganja namijenjen ljudima i trebalo bi je upotrebljavati samo uz posebno znanstveno opravdanje. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do uzorkovanja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (vidjeti stavke 33. i 34.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti sondom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen uobičajeno ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina gdje je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g tjelesne mase. Opravdanost primjene većih volumena od navedenog trebalo bi dokazati. Osim kod nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija, za koje je uobičajeno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena trebalo bi podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod primjene svih visina doze osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Plan tretiranja

Ispitivane kemikalije uobičajeno se primjenjuju jednokratno, ali se mogu primjenjivati i u podijeljenoj dozi (odnosno kao dva ili više doziranja u istom danu u razmaku od najviše dva do tri sata) kako bi se olakšalo davanje velikog volumena. U tim okolnostima ili pri primjeni ispitivane kemikalije inhalacijom, vrijeme uzorkovanja trebalo bi planirati na temelju vremena posljednje doze ili završetka izlaganja.

Malo je podataka dostupno o prikladnosti protokola o primjeni ponovljenih doza za ovo ispitivanje. Međutim, u okolnostima u kojima je poželjno ovo ispitivanje uključiti u ispitivanje toksičnosti s ponovljenim dozama trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegne gubitak mitotskih stanica s oštećenim kromosomima koje mogu nastati pri toksičnim dozama. Takvo je uključivanje prihvatljivo ako je

▼M7

najviša doza veća od granične doze ili jednaka graničnoj dozi (vidjeti stavak 29.) i ako se na skupinu koja prima dozu primijeni granična doza tijekom razdoblja tretiranja. Mikronukleus-test (ispitnu metodu B.12.) trebalo bi smatrati preferiranim *in vivo* ispitivanjem kromosomskih aberacija ako je poželjna integracija s drugim istraživanjima.

Uzorci koštane srži trebali bi se uzimati odvojeno u dva navrata nakon pojedinačnih tretiranja. Ako je riječ o glodavcima, prvi interval uzorkovanja trebalo bi biti vrijeme potrebno za završetak 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa (pri čemu potonji uobičajeno traje 12 – 18 sati nakon razdoblja tretiranja). Budući da vrijeme potrebno za unos i metabolizam ispitivane kemikalije i za njezino djelovanje na kinetiku staničnog ciklusa može utjecati na optimalno vrijeme za otkrivanje kromosomskih aberacija, preporuča se još jedno uzimanje uzorka 24 sata nakon vremena prvog uzorkovanja. U vrijeme prvog uzorkovanja trebalo bi tretirati sve skupine koje primaju dozu i prikupiti uzorke za analizu; međutim, u vrijeme kasnijeg uzorkovanja potrebno je primijeniti samo najvišu dozu. Ako se primjenjuju postupci primjene doze u trajanju duljem od jednog dana gdje je to znanstveno opravdano, općenito bi trebalo primijeniti samo jedno vrijeme uzorkovanja po isteku vremena od približno 1,5 uobičajenog staničnog ciklusa nakon posljednjeg tretiranja.

Nakon tretiranja i prije uzimanja uzoraka životinjama se intraperitonealnom injekcijom daje prikladna doza agensa za zaustavljanje metafaze (npr. kolcemida ili kolhicina) te se nakon toga u prikladnom intervalu uzimaju uzorci. Za miševe je taj interval približno tri sata do pet sati prije uzimanja uzorka, a za štakore dva sata do pet sati. Stanice se izdvajaju iz koštane srži, bubre, fiksiraju i boje te zatim analiziraju kako bi se utvrdile kromosomske aberacije (12.).

Zapažanja

Opća klinička zapažanja o pokusnim životinjama i kliničke znakove trebalo bi bilježiti najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon primjene doze. Najmanje dva puta dnevno tijekom razdoblja primjene doze trebalo bi provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili mortaliteta životinja. Sve životinje trebalo bi izvagati na početku istraživanja, najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama i pri eutanaziji. U istraživanjima koja traju najmanje tjedan dana trebalo bi najmanje jednom tjedno mjeriti unos hrane. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, trebalo bi mjeriti i unos vode pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno. Životinje u kojih su vidljivi nesmrtonosni pokazatelji prekomjerne toksičnosti trebalo bi humano eutanazirati prije završetka ispitnog razdoblja (11.).

Izlaganje ciljnog tkiva

Uzorak krvi trebalo bi uzeti u prikladnom trenutku / prikladnim trenucima kako bi se omogućilo istraživanje razina plazme ispitivane kemikalije u cilju dokazivanja da je došlo do izlaganja koštane srži, ako je to opravdano i ako ne postoje drugi podaci o izlaganju (vidjeti stavak 44.).

Preparati koštane srži i kromosomski preparati

Stanice koštane srži uzimaju se iz femura ili tibije životinja odmah nakon humane eutanazije, izlažu hipotoničkoj otopini i fiksiraju. Metafazne stanice zatim se nanose na predmetna stakalca i boje primjenom utvrđenih metoda (vidjeti 3. i 12.).

▼M7

Analiza

Sva predmetna stakalca, uključujući i ona za pozitivne i negativne kontrole, trebalo bi prije analize neovisno kodirati i pregledati nasumično tako da analitičar ne zna za uvjete tretiranja.

Kao mjerilo toksičnosti trebalo bi odrediti mitotski indeks u najmanje 1 000 stanica po životinji za sve tretirane životinje (uključujući pozitivne kontrole), netretirane životinje iz negativnih kontrola ili životinje iz negativnih kontrola s nosačem/otapalom.

Za svaku životinju trebalo bi analizirati najmanje 200 metafaza radi utvrđivanja strukturnih kromosomskih aberacija, uključujući i isključujući kromosomske prekide (6.). Međutim, ako je u bazi podataka o prijašnjim negativnim kontrolama navedeno da je prosječna učestalost osnovne pojavnosti strukturnih kromosomskih aberacija < 1 % u ispitnom laboratoriju, trebalo bi razmotriti vrednovanje dodatnih stanica. Aberacije kromatidnog i kromosomskog tipa trebalo bi bilježiti odvojeno i klasificirani prema podtipovima (lomovi, zamjene). U postupcima koji se primjenjuju u laboratoriju trebalo bi osigurati da analizu kromosomskih aberacija provode dobro osposobljeni analitičari te da je, prema potrebi, pregledaju stručnjaci. Uzimajući u obzir da postupci pripreme predmetnih stakalaca često za posljedicu imaju lom jednog dijela metafaza uz posljedični gubitak kromosoma, stanice koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržavati broj centromera koji nije manji od $2n \pm 2$, pri čemu je n haploidan broj kromosoma za tu vrstu.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Podatke o pojedinačnim životinjama trebalo bi prikazati u tabličnom obliku. Za svaku životinju trebalo bi ocijeniti mitotski indeks, broj pregledanih metafaznih stanica, broj aberacija po metafaznoj stanici i postotak stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama. Trebalo bi navesti različite tipove strukturnih kromosomskih aberacija zajedno s njihovim brojem i učestalošću za tretirane i kontrolne skupine. Kromosomski prekidi, poliploidne stanice i stanice s endoreduplicirani kromosomima bilježe se odvojeno. Iako se bilježi učestalost kromosomskih prekida, ona se općenito ne uključuje u analizu ukupne učestalosti strukturnih aberacija. Ako nema dokaza o razlikama u odgovoru između spolova, za statističku analizu mogu se kombinirati podaci. Trebalo bi bilježiti i podatke o toksičnosti za životinje i o kliničkim znakovima.

Kriteriji prihvatljivosti

Na temelju sljedećih kriterija utvrđuje se prihvatljivost ispitivanja:

a) smatra se da je podatke o istodobnim negativnim kontrolama prihvatljivo dodati u bazu podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama (vidjeti stavke 11. – 14.);

b) istodobnim pozitivnim kontrolama ili kontrolama vrednovanja trebalo bi izazvati odgovore koji su u skladu s onima generiranima u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti stavke 20. – 21.);

c) analiziran je prikladan broj doza i stanica;

d) kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 25. – 28.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

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

▼M7

a) ako je najmanje u jednoj tretiranoj skupini zapaženo statistički značajno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama (isključujući kromosomske prekide) u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b) odgovarajući test trenda pokazuje da je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom te

c) ako bilo koji od tih rezultata nije uključen u distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji).

Ako se u određeno vrijeme uzorkovanja ispituje samo najviša doza, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako postoji statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu i ako rezultati nisu uključeni u distribuciju povijesnih podataka o negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji). Preporuke za prikladne statističke metode nalaze se u literaturi (13.). Pri analizi odgovora na dozu trebalo bi analizirati najmanje tri skupine tretirane dozom. U statističkim testovima trebalo bi upotrebljavati životinju kao pokusnu jedinicu. Pozitivnim rezultatima ispitivanja kromosomskih aberacija dokazuje se da ispitivana kemikalija izaziva strukturne kromosomske aberacije u koštanoj srži ispitne vrste.

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

a) ni kod jedne tretirane skupine nije zapaženo statistički značajno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama (isključujući kromosomske prekide) u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b) odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s dozom ni u jednom vremenu uzorkovanja;

c) svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji) te

d) došlo je do izlaganja koštane srži ispitivanoj kemikaliji.

Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (13.). Dokaz o izlaganju koštane srži ispitivanoj kemikaliji može uključivati smanjenje mitotskog indeksa ili mjerenje razina plazme ili krvi ispitivane kemikalije. U slučaju intravenozne primjene nije potreban dokaz o izlaganju. Kao druga mogućnosti, podaci o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji (ADME), dobiveni u okviru neovisnog istraživanja u kojem su se upotrebljavali jednaki način izlaganja i jednaka vrsta, mogu se upotrijebiti za dokazivanje izlaganja koštane srži. Negativnim rezultatima dokazuju se da u ispitnim uvjetima ispitivana kemikalija ne izaziva strukturne kromosomske aberacije koštane srži ispitnih vrsta.

Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata (npr. blago ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja postojećih završenih pokusa. U nekim slučajevima može biti korisno analizirati više stanica ili provesti ponovljeni pokus uz primjenu izmijenjenih pokusnih uvjeta.

▼M7

U rijetkim slučajevima, čak i nakon daljnjih istraživanja, na temelju dobivenih podataka neće biti moguće donijeti zaključak da ispitivana kemikalija uzrokuje pozitivne ili negativne rezultate, te će se stoga zaključiti da je istraživanje dvosmisleno.

Učestalost poliploidnih i endoreduplicirani metafaza među ukupnim metafazama trebalo bi zabilježiti odvojeno. Povećanje broja poliploidnih/endoreduplicirani stanica može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati mitotske procese ili progresiju staničnog ciklusa (vidjeti stavak 3.).

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Sažetak

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

— opisane koliko god je to moguće kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

— opravdanost odabira nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,

— priprema prehrambenih pripravaka, vode za piće ili inhalacijskih pripravaka,

— analitička određivanja pripravaka (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se provode.

Ispitne životinje:

— vrsta/soj te obrazloženje njihove uporabe,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— metoda jedinstvenog identificiranja životinja,

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

▼M7

Ispitni uvjeti:

— pozitivne i negativne kontrole (s nosačem/otapalom),

— podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je provedeno,

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— obrazloženje odabira načina i trajanja primjene,

— metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u krvotok ili koštanu srž,

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase dnevno) izračunata iz koncentracije ispitivane kemikalije u hrani / vodi za piće (ppm) i unosa, ako je to primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— metoda eutanazije,

— metoda analgezije (ako se primjenjuje),

— detaljan opis rasporeda tretiranja i uzorkovanja te opravdanje za odabire,

— metode pripreme predmetnih stakalaca,

— metode mjerenja toksičnosti,

— identitet kemikalije za zaustavljanje metafaze, njezina koncentracija, doza i vrijeme primjene prije uzorkovanja,

— postupak izdvajanja i očuvanja uzoraka,

— kriteriji vrednovanja aberacija,

— broj analiziranih metafaznih stanica po životinji i broj analiziranih stanica za utvrđivanje mitotskog indeksa,

— kriteriji prihvatljivosti istraživanja,

— kriteriji na temelju kojih se istraživanja smatraju pozitivnima, negativnima ili dvosmislenima.

Rezultati:

— stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući i znakove toksičnosti,

— mitotski indeks navodi se odvojeno za svaku životinju,

— tip i broj aberacija i atipičnih stanica navodi se odvojeno za svaku životinju,

— ukupan broj aberacija po skupini sa srednjim izmjerenim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— broj stanica s aberacijama po skupini sa srednjim izmjerenim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— promjene ploidije ako su zapažene, uključujući učestalost poliploidnih i/ili endoredupliciranih stanica,

▼M7

— odnos doze i odgovora, ako je to moguće,

— primijenjene statističke analize i metode,

— podaci kojima se potvrđuje da je došlo do izlaganja koštane srži,

— podaci o istodobnim negativnim i pozitivnim kontrolama s rasponima, srednjim izmjerenim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— podaci o prijašnjim negativnim i pozitivnim kontrolama s rasponima, srednjim izmjerenim vrijednostima, standardnim odstupanjima te kontrolnim granicama od 95 % za distribuciju, kao i obuhvaćeno razdoblje te broj zapažanja,

— ispunjeni kriteriji u pogledu pozitivnog ili negativnog odgovora.

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

Literatura.

LITERATURA

1. OECD (2016). Pregled skupa smjernica OECD-a za ispitivanje u području genetske toksikologije te ažuriranja iz 2014. i 2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2. Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, u Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, str. 275. – 306.

3. Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, str. 157. – 165.

4. Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, u Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115. – 141.

5. Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, str. 305. – 312.

6. Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, str. 19. – 30.

7. Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

8. Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, str. 87. – 90.

9. Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, str. 293. – 304.

10. Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, str. 313. – 319.

▼**M7**

11. OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N^{o}19, OECD Publishing, Paris.

12. Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, str. 147. – 163.

13. Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, u Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184. – 232.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne za više kromosoma u cijelom skupu ili skupovima kromosoma (usp. poliploidija).

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

Endoreduplikacija: proces kod kojeg nakon S-faze replikacije DNK ne slijedi mitoza jezgre, nego započinje druga S-faza. Rezultat su kromosomi s 4, 8, 16… kromatida.

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

Mitotski indeks: omjer broja stanica u mitozi i ukupnog broja stanica u populaciji, koji je mjerilo statusa proliferacije te populacije stanica.

Numerička aberacija: promjena broja kromosoma u odnosu na uobičajeni broj svojstven upotrijebljenim životinjama (aneuploidija).

Poliploidija: numerička aberacija kromosoma koja uključuje promjenu broja cjelokupnog skupa kromosoma za razliku od numeričke promjene dijela skupa kromosoma (vidjeti aneuploidiju).

Strukturna kromosomska aberacija: promjena u strukturi kromosoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom diobe stanica u metafazi, zapažena kao brisanja i fragmenti, intrakromosomske promjene ili interkromosomske promjene.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M7

Dodatak 2.

FAKTORSKI MODEL ZA UTVRĐIVANJE RAZLIKA MEĐU SPOLOVIMA U *IN VIVO* ANALIZI KROMOSOMSKIH ABERACIJA

Faktorski model i njegova analiza

U okviru faktorskog modela ispituje se minimalno pet mužjaka i pet ženki pri svakoj razini koncentracije, a posljedica je model s minimalno 40 životinja (20 mužjaka i 20 ženki plus relevantne pozitivne kontrole).

Model, koji je jedan od jednostavnijih faktorskih modela, istovjetan je dvosmjernoj analizi varijance (ANOVA) sa spolom i razinom koncentracije kao glavnim učincima. Podaci se mogu analizirati primjenom mnogih standardnih statističkih softverskih paketa kao što su SPSS, SAS, STATA i Genstat, kao i primjenom R.

Analizom se varijabilnost skupa podataka razdjeljuje na varijabilnost između spolova, varijabilnost među koncentracijama i varijabilnost koja je povezana s interakcijom između spolova i koncentracija. Svaka od vrijednosti ispituje se u odnosu na procijenjenu varijabilnost među životinjama iz skupina životinja istog spola kojima je dana jednaka koncentracija. Potpuni podaci o osnovnoj metodologiji dostupni su u brojnim standardnim statističkim priručnicima (vidjeti literaturu) i sadržajima za pomoć osiguranima u okviru statističkih paketa.

U analizi se nakon toga ispituje vrijednost interakcije spol x koncentracija u ANOVA tablici ([1]). U slučaju izostanka značajne vrijednosti interakcije, kombiniranim vrijednostima za spolove ili razine koncentracije osiguravaju se valjanja statistička ispitivanja među razinama na temelju vrijednosti varijabilnosti ANOVA-e objedinjena unutar skupine.

Analiza se nastavlja razdjeljivanjem procijenjene varijabilnosti među koncentracijama na kontraste kojima se osigurava ispitivanje linearnih i kvadratnih kontrasta odgovora unutar razina koncentracije. Ako je prisutna značajna interakcija spol x koncentracija, ta se vrijednost jednako tako može razdijeliti na linearne kontraste interakcije x spol i kvadratne kontraste interakcije x spol. Na temelju tih vrijednosti provode se ispitivanja kojima se utvrđuje jesu li odgovori na koncentraciju paralelni za oba spola odnosno postoji li razlika u odgovoru između dvaju spolova.

Procijenjena varijabilnost, koja je objedinjena unutar skupine, može se upotrijebiti za provedbu ispitivanja parova za utvrđivanje razlike između srednjih izmjerenih vrijednosti. Usporedbe se mogu napraviti između srednjih izmjerenih vrijednosti za oba spola i među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite razine koncentracije, kao, na primjer, za usporedbe s negativnim kontrolnim razinama. U slučajevima značajne interakcije može se napraviti usporedba među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite koncentracije unutar spola ili između srednjih izmjerenih vrijednosti za spolove pri jednakoj koncentraciji.

Literatura

Mnogo je statističkih priručnika u kojima se raspravlja o teoriji, planiranju, metodologiji, analizi i tumačenju faktorskih modela, od najjednostavnijih analiza s dva čimbenika do složenijih oblika koji se primjenjuju u metodologiji planiranja pokusa. U nastavku se nalazi nepotpuni popis. U nekima od priručnika navedeni su razrađeni primjeri usporedivih modela, u određenim slučajevima s kodom za provedbu analiza uz primjenu različitih softverskih paketa.

([1]) Statističari koji primjenjuju model poput općih linearnih modela (GLM – *General Linear Models*) mogu provoditi analizu na drukčiji, ali usporediv način, no rezultat neće nužno biti tradicionalna tablica ANOVA koja datira iz vremena algoritamskih pristupa statističkim izračunima razvijenih u predinformatičko doba.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. MIKRONUKLEUS-TEST NA ERITROCITIMA SISAVACA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 474 (2016.). Dio je serije metoda za ispitivanje genetske toksikologije. Razvijen je i dokument OECD-a u kojemu se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena tih ispitnih smjernica (1).

In vivo mikronukleus-test na sisavcima posebno je relevantan za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK *in vivo* aktivni su i pridonose odgovorima. *In vivo* test koristan je i za daljnje istraživanje genotoksičnosti otkrivene nekim *in vitro* sustavom.

In vivo mikronukleus-test na sisavcima primjenjuje se za otkrivanje oštećenja kromosoma ili oštećenja mitotskog aparata eritroblasta izazvanih ispitivanom kemikalijom. Ispitivanjem se ocjenjuje nastajanje mikronukleusa u eritrocitima uzorkovanih iz stanica koštane srži ili periferne krvi životinja, uobičajeno glodavaca.

Svrha mikronukleus-testa jest utvrđivanje kemikalija koje izazivaju citogenetska oštećenja zbog kojih dolazi do nastajanja mikronukleusa koji sadržavaju zaostale fragmente kromosoma ili čitave kromosome.

Kada se eritroblast koštane srži razvije u nezreli eritrocit (koji se ponekad naziva i polikromatski eritrocit ili retikulocit), dolazi do istiskivanja glavnog nukleusa; bilo koji nastali mikronukleus može zaostati u citoplazmi. Vidljivost ili otkrivanje mikronukleusa u tim je stanicama olakšano jer im nedostaje glavni nukleus. Povećanje učestalosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima kod tretiranih životinja pokazatelj je izazvanih strukturnih ili numeričkih kromosomskih aberacija.

Novonastali eritrociti s mikronukleusima utvrđuju se i kvantificiraju bojenjem, nakon čega slijedi vizualno očitavanje mikroskopom ili automatska analiza. Prebrojavanje dovoljnog broja nezrelih eritrocita u perifernoj krvi ili koštanoj srži odraslih životinja u velikoj je mjeri olakšano uporabom platforme za automatsko očitavanje. Takve su platforme prihvatljiva alternativa ručnom prebrojavanju (2.). Usporednim istraživanjima dokazano je da se takvim metodama, u kojima se primjenjuju prikladni standardi kalibracije, mogu osigurati bolja međulaboratorijska i unutarlaboratorijska obnovljivost i osjetljivost nego ručnim mikroskopskim očitavanjem (3. i 4.). Automatski sustavi kojima se može mjeriti učestalost eritrocita s mikronukleusima uključuju, među ostalim, protočne citometre (5.), platforme za analizu slike (6. i 7.) i citometre s laserskim skeniranjem (8.).

Iako se to uobičajeno ne radi u okviru ispitivanja, fragmenti kromosoma mogu se razlikovati od čitavih kromosoma na temelju niza kriterija. Oni uključuju utvrđivanje prisutnosti ili odsutnosti kinetohore ili centromernog DNK, koji su oboje svojstveni netaknutim kromosomima. Odsutnost kinetohore ili centromernog DNK znači da mikronukleus sadržava samo fragmente kromosoma, dok njihova prisutnost znači gubitak kromosoma.

Upotrijebljene definicije terminologije navedene su u Dodatku 1.

▼M7

POČETNA RAZMATRANJA

Ciljno je tkivo za genetska oštećenja u ovom ispitivanju koštana srž mladih odraslih glodavaca jer u tom tkivu nastaju eritrociti. Mjerenje mikronukleusa u nezrelim eritrocitima u perifernoj krvi prihvatljivo je kod drugih vrsta sisavaca za koje je dokazana odgovarajuća osjetljivost na otkrivanje kemikalija koje uzrokuju strukturne ili numeričke kromosomske aberacije u tim stanicama (nastankom mikronukleusa u nezrelim eritrocitima) i za koje je navedeno znanstveno opravdanje. Učestalost nezrelih eritrocita s mikronukleusima glavna je krajnja točka. Učestalost zrelih eritrocita s mikronukleusima u perifernoj krvi jednako se tako može primijeniti kao krajnja točka kod vrsta bez snažne selekcije stanica s mikronukleusima u slezeni i u slučajevima kada se životinje neprekidno tretiraju tijekom razdoblja duljeg od životnog vijeka eritrocita kod upotrijebljene vrste (npr. četiri tjedna ili dulje kod miševa).

Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezin metabolit neće dospjeti do ciljnog tkiva, ovaj oblik ispitivanja možda nije prikladan.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO ISPITNE METODE

Životinje se na odgovarajući način izlažu ispitivanoj kemikaliji. Ako se upotrebljava koštana srž, životinje se humano eutanaziraju u prikladnom trenutku nakon tretiranja, uzima se koštana srž te se pripremaju mikroskopski preparati koji se zatim boje (9., 10., 11., 12., 13., 14. i 15.). Kada se upotrebljava periferna krv, u prikladnom trenutku nakon tretiranja uzima se krv te se pripremaju mikroskopski preparati koji se zatim boje (12., 16., 17. i 18.). Ako se tretiranje provodi akutno, važno je odabrati vrijeme uzimanja koštane srži i krvi u koje se može otkriti nastanak nezrelih eritrocita s mikronukleusima koji je povezan s tretiranjem. U slučaju uzorkovanja periferne krvi, mora proći dovoljno vremena kako bi došlo do pojave tih događaja u cirkulirajućoj krvi. Prisutnost mikronukleusa u preparatima analizira se vizualizacijom uz uporabu mikroskopa, analizom slike, protočnom citometrijom ili citometrijom s laserskim skeniranjem.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Istraživanja osposobljenosti

Kako bi se utvrdilo dostatno iskustvo u provedbi testa prije njegove uporabe za rutinsko ispitivanje, laboratorij bi trebao dokazati sposobnost stvaranja očekivanih rezultata na temelju objavljenih podataka (17., 19., 20., 21. i 22.) za učestalosti mikronukleusa s najmanje dvije kemikalije pozitivnih kontrola (uključujući slabe odgovore izazvane niskom dozom pozitivnih kontrola), kao što su one navedene u tablici 1., i s kompatibilnim kontrolama s nosačem/otapalom (vidjeti stavak 26.). U tim bi se pokusima trebale upotrebljavati doze na temelju kojih se dobivaju ponovljiva povećanja povezana s dozom i dokazuju osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava u pogledu ciljnog tkiva (koštane srži ili periferne krvi) uz uporabu metode vrednovanja koja će se upotrebljavati u laboratoriju. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom ranijih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavaka od 14. do 18.

Podaci o prijašnjim kontrolama

Tijekom istraživanja osposobljenosti laboratorij bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola te

▼M7

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola.

Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama, ako oni postoje. Nakon što se distribuciji prijašnjih kontrola doda još podataka o pokusima, paralelne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi biti statistički čvrsta kako bi se osigurala sposobnost laboratorija za ocjenjivanje distribucije podataka o negativnim kontrolama. U literaturi je navedeno da može biti potrebno najmanje deset pokusa, ali bilo bi poželjno da podaci obuhvaćaju najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami (23.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci i dokazali da je u njihovom laboratoriju metodologija „pod kontrolom”. Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati ranije podatke (npr. kriterije za uključivanje podataka u ranije podatke i za isključivanje iz njih i kriterije prihvatljivosti za određeni pokus) mogu se pronaći se u literaturi (24.).

Ako laboratorij ne provede dovoljan broj pokusa za utvrđivanje statistički čvrste distribucije negativnih kontrola (vidjeti stavak 15.) tijekom istraživanja osposobljenosti (kako je opisano u stavku 13.), prihvatljiva je uspostava distribucije tijekom prvih rutinskih ispitivanja. Taj bi pristup trebao biti u skladu s preporukama iz literature (24.), a rezultati dobiveni negativnim kontrolama u tim pokusima trebali bi biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim kontrolama.

Sve izmjene protokola pokusa trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li njihov učinak na dobivene podatke ostao u skladu s postojećom bazom podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Samo veće neusklađenosti trebale bi za posljedicu imati uspostavljanje nove baze podataka o prijašnjim kontrolama, pri čemu se na temelju stručne prosudbe utvrđuje da je riječ o razlici u odnosu na prijašnju distribuciju (vidjeti stavak 15.). Tijekom ponovnog uspostavljanja možda neće biti potrebna potpuna baza podataka o negativnim kontrolama za provedbu stvarnog ispitivanja pod uvjetom da laboratorij može dokazati da su vrijednosti paralelnih negativnih kontrola ostale u skladu s prijašnjom bazom podataka ili s odgovarajućim objavljenim podacima.

Podaci o negativnim kontrolama trebali bi uključivati pojavnost nezrelih eritrocita s mikronukleusima kod svake životinje. Istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnim okolnostima biti unutar kontrolnih granica od 95 % za distribuciju baze podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama. Ako su podaci o paralelnim negativnim kontrolama izvan kontrolnih granica od 95 %, njihovo je uključivanje u distribuciju prijašnjih kontrola prihvatljivo sve dok ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti i ako postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 15.) i ako nema dokaza o tehničkoj ili ljudskoj pogrešci.

OPIS METODE

Preparati

Odabir životinjske vrste

Trebalo bi upotrebljavati zdrave mlade odrasle životinje sojeva koji se uobičajeno upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Mogu se upotrebljavati miševi, štakori ili bilo koja druga prikladna vrsta sisavaca. Ako se upotrebljava periferna krv, mora se utvrditi da se uklanjanjem stanica s mikronukleusima iz krvotoka u slezeni ne ugrožava otkrivanje nastalih mikronukleusa kod odabranih vrsta. To je

▼M7

jasno dokazano za perifernu krv miševa i štakora (2.). U izvješću bi trebalo navesti znanstveno opravdanje za uporabu drugih vrsta osim štakora i miševa. Ako se upotrebljavaju druge vrste osim glodavaca, preporučuje se uvrštavanje mjerenja nastalih mikronukleusa u drugo prikladno ispitivanje toksičnosti.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

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

Priprema životinja

Uobičajeno se upotrebljavaju zdrave mlade odrasle životinje (u slučaju glodavaca, u idealnim okolnostima životinje u dobi od šest do deset tjedana na početku tretiranja, iako su prihvatljive i nešto starije životinje) koje se nasumično određuju za kontrolne i skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje identificiraju se jedinstvenom humanom, najmanje invazivnom metodom (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem uha ili prsta) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku studije variranje tjelesne mase životinja trebalo bi biti što manje i ne bi trebalo prelaziti ±20 % odgovarajuće srednje vrijednosti mase svakog spola.

Priprema doza

Prije no što se doza da životinjama, krute ispitivane kemikalije trebalo bi otopiti ili suspendirati u prikladnim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Ako se unose inhaliranjem, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uvjeti

Otapalo/nosač

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

▼M7

Kontrole

Pozitivne kontrole

U svako ispitivanje trebalo bi uobičajeno uključiti skupinu životinja tretiranih kemikalijom pozitivne kontrole. Od toga se može odstupiti ako je ispitni laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja i uspostavio raspon prijašnjih pozitivnih kontrola. Ako nije uključena istodobna pozitivna kontrolna skupina, u svaki bi pokus trebalo uključiti kontrole vrednovanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca ili uzorke suspenzije stanica, ovisno o tome što je prikladno za metodu vrednovanja). Njih se može dobiti uključivanjem u vrednovanje istraživanja prikladnih referentnih uzoraka koji su dobiveni i pohranjeni iz zasebnog pozitivnog kontrolnog pokusa koji se provodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci); na primjer, tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovito nakon toga, ako je to potrebno.

Kemikalije pozitivne kontrole trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti mikronukleusa iznad spontane razine. Kada se primjenjuje ručna analiza mikroskopom, doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da učinci budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Prihvatljiva je drukčija primjena pozitivnih kontrola u odnosu na primjenu ispitivane kemikalije, uz uporabu drukčijeg rasporeda tretiranja, te provedba uzorkovanja u samo jednom trenutku. Osim toga, može se razmotriti uporaba kemikalija pozitivne kontrole koje pripadaju istoj kategoriji opasnosti kao i ispitivana kemikalija, ako je to prikladno. Primjeri kemikalija pozitivne kontrole navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.

Primjeri kemikalija pozitivne kontrole.

Kemikalije i CAS br.
Etil metansulfonat [CAS br. 62-50-0]
Metil metansulfonat [CAS br. 66-27-3]
Etil-nitrozourea [CAS br. 759-73-9]
Mitomicin C [CAS br. 50-07-7]
Ciklofosfamid (monohidrat) [CAS br. 50-18-0 (CAS br. 6055-19-2)]
Trietilenmelamin [CAS br. 51-18-3]
Kolhicin [CAS br. 64-86-8] ili vinblastin [CAS br. 865-21-4] – kao aneugeni

Negativne kontrole

Životinje iz negativnih kontrolnih skupina trebalo bi uključiti kod svakog uzorkovanja te bi s njima trebalo postupati jednako kao i sa skupinama za tretiranje, uz izostanak tretiranja ispitivanom kemikalijom. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije upotrebljava nosač/otapalo, kontrolna skupina trebala bi dobiti taj nosač / to otapalo. Međutim, ako se podacima o prijašnjim negativnim kontrolama dokažu dosljedna varijabilnost među životinjama i učestalost stanica s mikronukleusima za svako vrijeme uzorkovanja za ispitni laboratorij, za negativnu kontrolu može biti potrebno samo jedno uzorkovanje. Ako se za negativne kontrole upotrebljava samo jedno uzorkovanje, to bi trebalo biti vrijeme prvog uzorkovanje u istraživanju.

▼M7

Ako se upotrebljava periferna krv, za kratkotrajna istraživanja prihvatljiv je uzorak uzet prije tretiranja umjesto istodobne negativne kontrole ako su dobiveni podaci u skladu s bazom podataka o prijašnjim kontrolama za ispitni laboratorij. Za štakore je dokazano da uzorkovanje malih volumena prije tretiranja (npr. manje od 100 µl/dan) ima minimalan učinak na osnovnu učestalost mikronukleusa (25.).

POSTUPAK

Broj i spol životinja

Općenito, odgovor mikronukleusa sličan je kod mužjaka i ženki i stoga se većina istraživanja može provesti na bilo kojem spolu (26.). Podacima kojima se dokazuju relevantne razlike između mužjaka i ženki (npr. razlike u sustavnoj toksičnosti, metabolizmu, bioraspoloživosti, toksičnosti za koštanu srž itd., uključujući npr. istraživanje o utvrđivanju raspona) potaknula bi se uporaba obaju spolova. U tom slučaju može biti prikladno provesti istraživanje na oba spola, npr. kao dio istraživanja toksičnosti nakon ponovljene doze. Ako se upotrebljavaju oba spola, bilo bi primjereno primijeniti faktorski model. U Dodatku 2. navedeni su detalji o načinu analize podataka primjenom tog modela.

Na početku istraživanja trebalo bi utvrditi veličine skupina kako bi se po skupini osiguralo minimalno pet životinja istog spola, ili svakog spola ako se upotrebljavaju oba spola, prikladnih za analizu. U slučajevima kad izloženost ljudi nekoj kemikaliji može biti povezana sa spolom, kao što je slučaj s nekim farmaceutskim sredstvima, ispitivanje bi trebalo obaviti na životinjama odgovarajućeg spola. Kao smjernica za maksimalne uobičajene zahtjeve u pogledu životinja, za istraživanje koštane srži koje se provodi u skladu s parametrima utvrđenima u stavku 37. s tri skupine koje primaju dozu i paralelnim negativnim i pozitivnim kontrolnim skupinama (pri čemu se svaka skupina sastoji od pet životinja istog spola) bilo bi potrebno od 25 do 35 životinja.

Visine doza

Ako se provodi preliminarno istraživanje o utvrđivanju raspona jer nisu već na raspolaganju prikladni podaci kao pomoć u odabiru doza, ono bi se trebalo provesti u istom laboratoriju uz uporabu iste vrste, soja, spola i postupaka tretiranja kao i u glavnom istraživanju (27.). Cilj istraživanja trebao bi biti utvrđivanje maksimalne doze tolerancije (MTD), koja je definirana kao najviša doza koja će se tolerirati bez dokaza o toksičnosti, povezane s ograničavanjem istraživanja (na primjer izazivanjem smanjenja tjelesne mase ili hematopoetske sustavne citotoksičnosti, isključujući smrt ili dokaze o boli, patnji ili stresu zbog kojih se zahtijeva humana eutanazija (28.).

Najviša doza može biti definirana i kao doza koja izaziva toksičnost za koštanu srž (npr. smanjenje udjela nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita u koštanoj srži ili perifernoj krvi za više od 50 %, ali ne manje od 20 % kontrolne vrijednosti). Međutim, pri analizi stanica pozitivnih na CD71 u perifernoj krvi (npr. u protočnoj citometriji), taj vrlo mladi dio nezrelih eritrocita odgovara na toksične izazove brže od veće kohorte nezrelih eritrocita pozitivnih na RNK. Stoga viša prividna toksičnost može biti vidljiva kod modela akutnog izlaganja u okviru kojih se ispituje dio nezrelih eritrocita pozitivnih na CD71 u usporedbi s modelima u kojima se utvrđuju nezreli eritrociti na temelju sadržaja RNK. Zbog toga se u slučaju pokusa u kojima tretiranje traje pet ili manje dana najviša doza za ispitivane kemikalije koje uzrokuju toksičnost može definirati kao doza koja uzrokuje statistički značajno smanjenje udjela nezrelih eritrocita pozitivnih na CD71 u ukupnom broju eritrocita, ali koja nije manja od 5 % kontrolne vrijednosti (29.).

▼M7

Kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava ili koje izazivaju postupke detoksifikacije koji mogu dovesti do smanjene izloženosti nakon dugotrajne primjene mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebalo bi ih ocijeniti od slučaja do slučaja.

Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija ne izaziva toksičnost u okviru istraživanja o utvrđivanju raspona ili na temelju postojećih podataka, najviša doza u razdoblju primjene od 14 dana ili više trebala bi biti 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a ako je razdoblje primjene kraće od 14 dana, 2 000 mg/kg/ tjelesne mase dnevno. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Ako je toksičnost ciljnog tkiva (koštane srži) zapažena pri svim ispitanim razinama doza, preporučuje se daljnje istraživanje pri netoksičnim dozama. Za istraživanja čiji je cilj potpunije opisati kvantitativne informacije o odgovoru na dozu mogu biti potrebne dodatne skupine koje primaju dozu. Za određene vrste ispitivanih kemikalija (npr. za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima) obuhvaćene posebnim zahtjevima ta se ograničenja mogu razlikovati.

Granično ispitivanje

Ako se pokusima o utvrđivanju raspona ili postojećim podacima o srodnim sojevima životinja dokaže da se postupkom tretiranja koji uključuje najmanje graničnu dozu (opisanu u nastavku) ne uzrokuju vidljivi toksični učinci (uključujući izostanak smanjenja proliferacije koštane srži ili druge dokaze o citotoksičnosti za ciljno tkivo) i ako se genotoksičnost ne očekuje na temelju *in vitro* istraživanja genotoksičnosti ili podataka o strukturno srodnim kemikalijama, potpuno istraživanje uz primjenu tri razine doza ne smatra se potrebnim, pod uvjetom da je dokazano da su ispitivane kemikalije dospjele do ciljnog tkiva (koštane srži). U takvim slučajevima može biti dovoljna jedna razina doze pri graničnoj dozi. Za razdoblje primjene od 14 dana ili više granična je doza 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno. Za razdoblje primjene od 14 dana ili manje granična je doza 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način ljudske izloženosti. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos hrane, unos vode za piće, lokalno potkožno, intravenozno, oralno (sondom), inhalacija, primjena u dušnik ili implantacija. U svakom slučaju, način izlaganja trebalo bi odabrati tako da se osigura prikladno izlaganje ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija općenito se ne preporučuje jer nije način izlaganja namijenjen ljudima i trebalo bi je upotrebljavati samo uz posebno znanstveno opravdanje. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do uzorkovanja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (vidjeti stavak 37.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti sondom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen uobičajeno ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina gdje je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g tjelesne mase. Opravdanost primjene većih volumena od navedenog trebalo bi dokazati. Osim kod nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija, za koje je uobičajeno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena trebalo bi podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod primjene svih visina doze osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

▼M7

Plan tretiranja

Poželjna je primjena dvaju ili više tretmana u intervalima od 24 sata, posebno ako je ovo ispitivanje sastavni dio drugih ispitivanja toksičnosti. Druga je mogućnost primjena jednog tretmana ako je to znanstveno opravdano (npr. ako je poznato da ispitivane kemikalije blokiraju stanični ciklus). Ispitivane kemikalije mogu se primjenjivati i u podijeljenoj dozi, odnosno kao dva ili više tretmana u istom danu u razmaku od najviše dva do tri sata, kako bi se olakšalo davanje velikog volumena. U tim okolnostima ili pri primjeni ispitivane kemikalije inhalacijom, vrijeme uzorkovanja trebalo bi planirati na temelju vremena posljednje doze ili završetka izlaganja.

Ispitivanje se može provoditi na miševima ili štakorima na jedan od sljedeća tri načina.

a. Životinje se ispitivanom kemikalijom tretiraju jedanput. Uzorci koštane srži uzimaju se najmanje dva puta (od nezavisnih skupina životinja), prvi put najranije 24 sata nakon tretiranja, ali najkasnije 48 sati nakon tretiranja, uz odgovarajuće intervale između uzorkovanja, osim ako je poznato da ispitivana kemikalija ima iznimno dug poluraspad. Ako se prvi uzorak uzme prije isteka 24 sata nakon tretiranja, to bi trebalo opravdati. Uzorci periferne krvi uzimaju se najmanje dva puta (od iste skupine životinja), prvi put najranije 36 sati nakon tretiranja i nakon toga u odgovarajućme intervalu / odgovarajućim intervalima, ali najkasnije 72 sata. U vrijeme prvog uzorkovanja trebalo bi tretirati sve skupine koje primaju dozu i prikupiti uzorke za analizu; međutim, u vrijeme kasnijeg uzorkovanja potrebno je primijeniti samo najvišu dozu. Ako se pri jednom od uzorkovanja otkrije pozitivan odgovor, dodatno uzorkovanje nije potrebno, osim ako su potrebne kvantitativne informacije o odgovoru na dozu. Opisana vremena izdvajanja stanica posljedica su kinetike pojave i nestanka mikronukleusa u tim dvama dijelovima tkiva.

b. Ako se tretman primjenjuje dva puta dnevno (npr. dva tretmana u intervalima od 24 sata), uzorke bi trebalo uzeti jedanput u razdoblju između 18 sati i 24 sata nakon posljednjeg tretiranja kada je u pitanju koštana srž i jedanput u razdoblju između 36 i 48 sati nakon posljednjeg tretiranja kada je u pitanju periferna krv (30.). Opisana vremena izdvajanja stanica posljedica su kinetike pojave i nestanka mikronukleusa u tim dvama dijelovima tkiva.

c. Ako se tretman primjenjuje tri ili više puta dnevno (npr. tri ili više tretmana u približnim intervalima od 24 sata), uzorke koštane srži trebalo bi uzeti u roku od 24 sata nakon posljednjeg tretiranja, dok bi uzorke periferne krvi trebalo uzeti u roku od 40 sati nakon posljednjeg tretiranja (31.). Tom se opcijom tretiranja omogućuju kombiniranje komet-testa (npr. uzorkovanja u roku od dva sata do šest sati nakon posljednjeg tretiranja) s mikronukleus-testom i uključivanje mikronukleus-testa u istraživanja toksičnosti s ponovljenim dozama. U prikupljenim je podacima navedeno da se nastanak mikronukleusa može zapaziti unutar tih širih okvira u slučaju tri primjene ili više njih (15.).

Ako je to relevantno i znanstveno opravdano te u cilju lakšeg uključivanja u druga ispitivanja toksičnosti, mogu se upotrebljavati drugi postupci primjene doza ili uzimanja uzoraka.

Zapažanja

Opća klinička zapažanja o ispitnim životinjama i kliničke znakove trebalo bi bilježiti najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon primjene doze. Najmanje dva puta dnevno tijekom razdoblja primjene doze trebalo bi provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili mortaliteta životinja. Sve bi životinje trebalo izvagati na početku istraživanja, najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama i pri eutanaziji. U istraživanjima koja traju najmanje tjedan dana trebalo bi najmanje jednom tjedno mjeriti unos hrane. Ako

▼M7

se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno trebalo bi mjeriti i unos vode. Životinje u kojih su vidljivi nesmrtonosni pokazatelji prekomjerne toksičnosti trebalo bi humano eutanazirati prije završetka ispitnog razdoblja (28.). U određenim okolnostima mogla bi se pratiti tjelesna temperatura životinja jer se navodi da su hipertermija i hipotermija izazvane tretiranjem dovele do netočnih rezultata (32., 33. i 34.).

Izlaganje ciljnog tkiva

Uzorak krvi trebalo bi uzeti u prikladnom trenutku / prikladnim trenucima kako bi se omogućilo istraživanje razina plazme ispitivane kemikalije u cilju dokazivanja da je došlo do izlaganja koštane srži, ako je to opravdano i ako ne postoje drugi podaci o izlaganju (vidjeti stavak 48.).

Preparati koštane srži / krvi

Stanice koštane srži uobičajeno se uzimaju iz femura ili tibije životinja odmah nakon humane eutanazije. Stance se uobičajeno uklanjaju, pripremaju i boje primjenom utvrđenih metoda. Male količine periferne krvi mogu se uzeti, u skladu s odgovarajućim standardima dobrobiti životinja, primjenom metode kojom se omogućuje preživljavanje ispitne životinje, kao što je krvarenje iz repne vene ili druge prikladne krvne žile, ili punkcijom srca ili uzorkovanjem iz velike žile pri eutanaziji životinje. Ovisno o metodi analize, za eritrocite dobivene iz koštane srži ili periferne krvi, stanice se mogu odmah supravitalno obojiti (16., 17. i 18.), nakon čega se preparati razmaza pripremaju i boje za mikroskopiju ili se fiksiraju i boje na prikladan način za analizu protočnom citometrijom. Uporabom boja specifičnih za DNK [kao što su npr. akridin oranž (35.) ili Hoechst 33258 i pironin-Y (36.)] mogu se ukloniti neki od artefakta povezanih s uporabom boja koje nisu specifične za DNK. Ta prednost ne isključuje uporabu konvencionalnih boja (kao što je npr. Giemsa za mikroskopsku analizu). Mogu se upotrebljavati i dodatni sustavi [npr. celulozne kolone za uklanjanje stanica s nukleusom (37. i 38.)], pod uvjetom da je dokazano da su ti sustavi usklađeni s pripremom uzoraka u laboratoriju.

Ako su te metode primjenjive, za utvrđivanje naravi mikronukleusa (kromosoma / fragmenata kromosoma) mogu se upotrebljavati antikinetohorna antitijela (39.), fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) pancentromernim sondama DNK (40.) ili primarno *in situ* označavanje početnicama specifičnima za pancentromere, zajedno s prikladnim protubojenjem DNK (41.), kako bi se utvrdilo je li mehanizam nastajanja mikronukleusa posljedica klastogenog i/ili aneugenog djelovanja. Za razlikovanje između klastogena i aneugena mogu se primjenjivati i druge metode ako su dokazano učinkovite.

Analiza (ručna i automatska)

Sva predmetna stakalca ili uzorke za analizu, uključujući i one za pozitivne i negativne kontrole, trebalo bi prije bilo kakve vrste analize neovisno kodirati i pregledati nasumično tako da analitičar ne zna za uvjete tretiranja; kodiranje nije nužno ako se primjenjuju sustavi za automatsko očitavanje koji se ne temelje na vizualnom pregledu i na koje ne može utjecati pristranost ispitivača. Za svaku se životinju utvrđuje udio nezrelih eritrocita u ukupnom broju (nezrelih + zrelih) eritrocita tako da se ukupno prebroji najmanje 500 eritrocita kada je u pitanju koštana srž i 2 000 eritrocita kada je u pitanju periferna krv (42.). Za utvrđivanje pojavnosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima za svaku bi životinju trebalo pregledati najmanje 4 000 nezrelih eritrocita (43.). Ako je u bazi podataka o prijašnjim negativnim kontrolama navedeno da je prosječna učestalost osnovne

▼M7

pojavnosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima < 0,1 % u ispitnom laboratoriju, trebalo bi razmotriti vrednovanje dodatnih stanica. Prilikom analize uzoraka, udio nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita tretiranih životinja ne bi trebao biti manji od 20 % udjela u kontroli s nosačem/otapalom pri očitavanju mikroskopijom i ne bi trebao biti manji od približno 5 % udjela u kontroli s nosačem/otapalom pri očitavanju nezrelih eritrocita pozitivnih na CD71 citometrijskim metodama (vidjeti stavak 31.) (29.). Na primjer, kod testa koštane srži u kojem se za analizu primjenjuje mikroskop, ako je kontrolni udio nezrelih eritrocita u koštanoj srži 50 %, gornja granična vrijednost toksičnosti bila bi 10 % nezrelih eritrocita.

Budući da se kod štakora eritrociti s mikronukleusima odvajaju i uništavaju u slezeni, za održavanje visoke razine osjetljivosti pri testu periferne krvi štakora poželjno je ograničiti analizu nezrelih eritrocita s mikronukleusima na najmlađi dio. Kada se primjenjuju metode automatske analize, najnezreliji eritrociti mogu se utvrditi na temelju njihova visokog sadržaja RNK ili visoke razine transferinskih receptora (CD71+) izraženih na njihovoj površini (31.). Međutim, izravnom usporedbom različitih metoda bojenja pokazalo se da se zadovoljavajući rezultati mogu dobiti različitim metodama, uključujući konvencionalno bojenje akridin oranžom (3. i 4.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Podatke o pojedinačnim životinjama trebalo bi prikazati u tabličnom obliku. Za svaku bi analiziranu životinju trebalo posebno navesti broj pregledanih nezrelih eritrocita, broj nezrelih eritrocita s mikronukleusima i udio nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita. Ako se miševi neprekidno tretiraju četiri tjedna ili dulje, trebalo bi navesti i podatke o broju i udjelu zrelih eritrocita s mikronukleusima ako su prikupljeni. Trebalo bi bilježiti i podatke o toksičnosti za životinje i o kliničkim znakovima.

Kriteriji prihvatljivosti

Na temelju sljedećih kriterija utvrđuje se prihvatljivost ispitivanja:

a. smatra se da je podatke o istodobnim negativnim kontrolama prihvatljivo dodati u bazu podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama (vidjeti stavke 15. – 18.);

b. istodobnim pozitivnim kontrolama ili kontrolama vrednovanja trebalo bi izazvati odgovore koji su u skladu s onima generiranima u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti stavke 24. i 25.);

c. analiziran je prikladan broj doza i stanica;

d. kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 30. – 33.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

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

a. ako je najmanje u jednoj tretiranoj skupini zapaženo statistički značajno povećanje učestalosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b. odgovarajući test trenda pokazuje da je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom te

c. ako bilo koji od tih rezultata nije uključen u distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji).

▼M7

Ako se u određeno vrijeme uzorkovanja ispituje samo najviša doza, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako postoji statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu i ako rezultati nisu uključeni u distribuciju povijesnih podataka o negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji). Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (44., 45., 46. i 47.). Pri analizi odgovora na dozu trebalo bi analizirati najmanje tri skupine tretirane dozom. U statističkim ispitivanjima trebalo bi upotrebljavati životinju kao pokusnu jedinicu. Pozitivni rezultati u mikronukleus-testu znače da ispitivana kemikalija uzrokuje nastanak mikronukleusa, koji su posljedica oštećenja kromosoma ili oštećenja mitotskog aparata eritroblasta ispitne vrste. Ako je ispitivanje provedeno radi otkrivanja centromera unutar mikronukleusa, ispitivana kemikalija koja uzrokuje nastanak mikronukleusa s centromerima (centromernim DNK ili kinetohorom koji ukazuju na gubitak čitavog kromosoma) dokaz je da je ispitivana kemikalija aneugen.

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

a. ni kod jedne tretirane skupine nije zapaženo statistički značajno povećanje učestalosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu;

b. odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s dozom ni u jednom vremenu uzorkovanja;

c. svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji) te

d. došlo je do izlaganja koštane srži ispitivanoj kemikaliji.

Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (44., 45., 46. i 47.). Dokaz o izlaganju koštane srži ispitivanoj kemikaliji može uključivati smanjenje omjera nezrelih i zrelih eritrocita ili mjerenje razina plazme ili krvi ispitivane kemikalije. U slučaju intravenozne primjene, nije potreban dokaz o izlaganju. Kao druga mogućnosti, podaci o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji (ADME), dobiveni u okviru neovisnog istraživanja u kojem su se upotrebljavali jednaki način izlaganja i jednaka vrsta, mogu se upotrijebiti za dokazivanje izlaganja koštane srži. Negativni rezultati znače da ispitivana kemikalija u ispitnim uvjetima ne uzrokuje nastanak mikronukleusa u nezrelim eritrocitima ispitne vrste.

Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata (npr. blago ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja postojećih završenih pokusa. U nekim slučajevima može biti korisno analizirati više stanica ili provesti ponovljeni pokus uz primjenu izmijenjenih pokusnih uvjeta.

U rijetkim slučajevima, čak i nakon daljnjih istraživanja, neće biti moguće na temelju dobivenih podataka donijeti zaključak da ispitivana kemikalija uzrokuje pozitivne ili negativne rezultate, te će se stoga zaključiti da je istraživanje dvosmisleno.

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Sažetak

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

▼M7

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

— opisane koliko god je to moguće kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

— opravdanost odabira nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,

— priprema prehrambenih pripravaka, vode za piće ili inhalacijskih pripravaka,

— analitička određivanja pripravaka (tj. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se provode.

Ispitne životinje:

— vrsta/soj te obrazloženje njihove uporabe,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— metoda jedinstvenog identificiranja životinja,

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

Ispitni uvjeti:

— podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),

— podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je provedeno,

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— obrazloženje odabira načina i trajanja primjene,

— metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u krvotok ili ciljno tkivo,

▼M7

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase dnevno) izračunata iz koncentracije ispitivane kemikalije u hrani / vodi za piće (ppm) i unosa, ako je to primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— metoda eutanazije,

— metoda analgezije (ako se primjenjuje),

— detaljan opis rasporeda tretiranja i uzorkovanja te opravdanje za odabire,

— metode pripreme predmetnih stakalaca,

— postupak izdvajanja i očuvanja uzoraka,

— metode mjerenja toksičnosti,

— kriteriji za vrednovanje nezrelih eritrocita s mikronukleusima,

— broj analiziranih stanica po životinji pri utvrđivanju učestalosti nezrelih eritrocita s mikronukleusima i za utvrđivanje omjera nezrelih i zrelih eritrocita,

— kriteriji prihvatljivosti istraživanja,

— metode, kao što su uporaba antikinetohornih antitijela ili sonda DNK specifičnih za centromere, kojima se određuje sadržavaju li mikronukleusi čitave ili fragmentirane kromosome, ako je to primjenjivo.

Rezultati:

— stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući i znakove toksičnosti,

— udio nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita,

— broj nezrelih eritrocita s mikronukleusima naveden zasebno za svaku životinju,

— srednja izmjerena vrijednost ± standardno odstupanje nezrelih eritrocita s mikronukleusima za svaku skupinu,

— odnos doze i odgovora, ako je to moguće,

— primijenjene statističke analize i metode.

— podaci o istodobnim negativnim i pozitivnim kontrolama s rasponima, srednjim izmjerenim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— podaci o prijašnjim negativnim i pozitivnim kontrolama s rasponima, srednjim izmjerenim vrijednostima, standardnim odstupanjima te kontrolne granice od 95 % za distribuciju, kao i razdoblje te broj točaka podataka,

— podaci kojima se potvrđuje da je došlo do izlaganja koštane srži,

— opisni podaci u kojima se navodi sadržavaju li mikronukleusi čitave ili fragmentirane kromosome, ako je to primjenjivo,

— ispunjeni kriteriji u pogledu pozitivnog ili negativnog odgovora.

▼**M7**

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

Literatura.

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2. Hayashi, M. *et al*. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, str. 10. – 30.

3. MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, str. 92. – 107.

4. Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, str. 83. – 91.

5. Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, str. 139. – 145.

6. Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, str. 65. – 73.

7. Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, str. 149. – 154.

8. Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, str. 153. – 155.

9. Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, str. 187. – 190.

10. Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, str. 9. – 15.

11. Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, str. 61. – 118.

12. Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, str. 29. – 80.

13. MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, str. 555. – 558.

▼**M7**

14. MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, str. 103. – 112.

15. MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, str. 513. – 522.

16. Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, str. 245. – 249.

17. CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, str. 83. – 98.

18. CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, str. 153. – 159.

19. Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, str. 239. – 273.

20. Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, str. 45. – 50.

21. Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, str. 419. – 424.

22. Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, str. 84. – 100.

23. Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

24. Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, str. 87. – 90.

25. Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, str. 108. – 120.

26. Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, str. 293. – 304.

27. Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, str. 313. – 319.

▼**M7**

28. OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

29. LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, str. 222. – 228.

30. Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, str. 313. – 319.

31. Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, str. 234. – 252.

32. Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, str. 79. – 83.

33. Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, str. 7. – 14.

34. Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, str. 120. – 127.

35. Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, str. 241. – 247.

36. MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, str. 269. – 275.

37. Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, str. 91. – 104.

38. Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, str. 121. – 126.

39. Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, str. 411. – 415.

40. Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, str. 297. – 302.

41. Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, str. 99. – 104.

42. Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, str. 97. – 99.

43. OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

44. Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays", u Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115. – 141.

45. Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", u Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184. – 232.

46. Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, str. 49. – 52.

47. Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, str. 233. – 241.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Eritroblast: rani stadij razvoja eritrocita, koji neposredno prethodi stadiju nezrelog eritrocita, gdje stanica još uvijek sadržava nukleus.

Kinetohor: proteinska struktura koja nastaje na centromeri eukariotskih stanica s pomoću koje se kromosom povezuje s mikrotubulnim polimerima iz mitotskog diobenog vretena tijekom mitoze i mejoze i koja tijekom diobe stanica razdvaja sestrinske kromatide.

Mikronukleusi: maleni nukleusi (jezgre), koji se nalaze uz glavne stanične jezgre i od njih su odvojeni, koje tijekom telofaze mitoze ili mejoze proizvode zaostali fragmenti kromosoma ili čitavi kromosomi.

Normokromatski ili zreli eritrocit: potpuno sazreli eritrocit koji je izgubio rezidualni RNK zaostao nakon enukleacije i/ili koji je izgubio druge stanične markere kratkog vijeka kojima je svojstveno da nestanu nakon enukleacije poslije konačne diobe eritroblasta.

Polikromatski ili nezreli eritrocit: novonastali eritrocit u prijelaznom razvojnom stadiju koji se zbog prisutnosti rezidualnog RNK u novonastaloj stanici može obojiti plavim i crvenim komponentama klasičnih bojila krvi kao što je Wrightova Giemsa. Takve novonastale stanice približno su jednake retikulocitima, koji postaju vidljivi primjenom vitalne boje zbog koje iz rezidualnog RNK grudanjem nastaje retikulum. Druge metode, uključujući monokromatsko bojenje RNK fluorescentnim bojama ili označavanje površinskih markera kratkog vijeka, kao što je CD71, fluorescentnim antitijelima, danas se često primjenjuju za utvrđivanje novonastalih crvenih krvnih stanica. Polikromatski eritrociti, retikulociti i eritrociti pozitivni na CD71 nezreli su eritrociti, iako svaka od skupina ima donekle drukčiju dobnu raspodjelu.

Retikulocit: Novonastali eritrocit obojen vitalnom bojom zbog koje iz rezidualnog staničnog RNK grudanjem nastaje svojstveni retikulum. Retikulociti i polikromatski eritrociti imaju sličnu staničnu dobnu raspodjelu.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M7

Dodatak 2.

FAKTORSKI MODEL ZA UTVRĐIVANJE RAZLIKA MEĐU SPOLOVIMA U *IN VIVO* MIKRONUKLEUS-TESTU

Faktorski model i njegova analiza

U okviru faktorskog modela ispituje se minimalno pet mužjaka i pet ženki pri svakoj razini koncentracije, a posljedica je model s minimalno 40 životinja (20 mužjaka i 20 ženki plus relevantne pozitivne kontrole).

Model, koji je jedan od jednostavnijih faktorskih modela, istovjetan je dvosmjernoj analizi varijance (ANOVA) sa spolom i razinom koncentracije kao glavnim učincima. Podaci se mogu analizirati primjenom mnogih standardnih statističkih softverskih paketa kao što su SPSS, SAS, STATA i Genstat, kao i primjenom R.

Analizom se varijabilnost skupa podataka razdjeljuje na varijabilnost između spolova, varijabilnost među koncentracijama i varijabilnost koja je povezana s interakcijom između spolova i koncentracija. Svaka od vrijednosti ispituje se u odnosu na procijenjenu varijabilnost među životinja iz skupina životinja istog spola kojima je dana jednaka koncentracija. Potpuni podaci o osnovnoj metodologiji dostupni su u brojnim standardnim statističkim priručnicima (vidjeti literaturu) i sadržajima za pomoć osiguranima u okviru statističkih paketa.

U analizi se nakon toga ispituje vrijednost interakcije spol x koncentracija u ANOVA tablici ([1]). U slučaju izostanka značajne vrijednosti interakcije, kombiniranim vrijednostima za spolove ili razine koncentracije osiguravaju se valjanja statistička ispitivanja među razinama na temelju vrijednosti varijabilnosti ANOVA-e objedinjena unutar skupine.

Analiza se nastavlja razdjeljivanjem procijenjene varijabilnosti među koncentracijama na kontraste kojima se osigurava ispitivanje linearnih i kvadratnih kontrasta odgovora unutar razina koncentracije. Ako je prisutna značajna interakcija spol x koncentracija, ta se vrijednost jednako tako može razdijeliti na linearne kontraste interakcije x spol i kvadratne kontraste interakcije x spol. Na temelju tih vrijednosti provode se ispitivanja kojima se utvrđuje jesu li odgovori na koncentraciju paralelni za oba spola odnosno postoji li razlika u odgovoru između dvaju spolova.

Procijenjena varijabilnost, koja je objedinjena unutar skupine, može se upotrijebiti za provedbu ispitivanja parova za utvrđivanje razlike između srednjih izmjerenih vrijednosti. Usporedbe se mogu napraviti između srednjih izmjerenih vrijednosti za oba spola i među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite razine koncentracije, kao, na primjer, za usporedbe s negativnim kontrolnim razinama. U slučajevima značajne interakcije može se napraviti usporedba među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite koncentracije unutar spola ili između srednjih izmjerenih vrijednosti za spolove pri jednakoj koncentraciji.

Literatura

Mnogo je statističkih priručnika u kojima se raspravlja o teoriji, planiranju, metodologiji, analizi i tumačenju faktorskih modela, od najjednostavnijih analiza s dva čimbenika do složenijih oblika koji se primjenjuju u metodologiji „planiranja pokusa”. U nastavku se nalazi nepotpuni popis. U nekima od priručnika navedeni su razrađeni primjeri usporedivih modela, u određenim slučajevima s kodom za provedbu analiza uz primjenu različitih softverskih paketa.

([1]) Statističari koji primjenjuju model poput općih linearnih modela (GLM – *General Linear Models*) mogu provoditi analizu na drukčiji, ali usporediv način, no rezultat neće nužno biti tradicionalna tablica ANOVA koja datira iz vremena algoritamskih pristupa statističkim izračunima razvijenih u predinformatičko doba.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13./14. **MUTAGENOST: TEST ZA OTKRIVANJE POVRATNIH MUTACIJA POMOĆU BAKTERIJA**

1. **METODA**

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 471, Bakterijski test povratnih mutacija (Bacterial Reverse Mutation Test) (1997.).

1.1. UVOD

Pri ispitivanju povratnih mutacija koriste se sojevi bakterija *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* kojima su potrebne aminokiseline, za otkrivanje točkastih mutacija koje uključuju supstituciju, adiciju ili deleciju jednog ili više baznih parova DNK (1)(2)(3). Načelo ovog bakterijskog testa povratnih mutacija je da test otkriva mutacije koje povratno djeluju na mutacije prisutne kod pokusnih sojeva i ponovo uspostavljaju funkcionalnu sposobnost bakterija da sintetiziraju esencijalne amino kiseline. Povratno mutirane bakterije raspoznaju se po njihovoj sposobnosti rasta u odsutnosti aminokiseline koja je potrebna za rast roditeljskom pokusnom soju.

Točkaste mutacije uzrokuju mnoge genetske bolesti u ljudi i postoje čvrsti dokazi da su povratne mutacije u onkogenima i tumor-supresorskim genima somatskih stanica povezane s nastajanjem tumora kod ljudi i pokusnih životinja. Test bakterijskih povratnih mutacija je brz, jeftin i relativno lako izvediv. Mnogi od pokusnih sojeva imaju nekoliko svojstava koja ih čine osjetljivijima za otkrivanje mutacija, uključujući i osjetljive nizove DNK na mjestima povratnih mutacija, povećanu propusnost stanica za velike molekule i eliminaciju sustava za popravak DNK ili poticanje procesa popravljanja DNK podložnih pojavi grešaka. Na specifičnostima pokusnih sojeva mogu se temeljiti neke korisne informacije o vrstama mutacija koje uzrokuju genotoksični agensi. Za testove bakterijskih povratnih mutacija postoji vrlo velika baza podataka u kojoj su sadržani rezultati za veliki broj različitih struktura, a razvijene su i dobro uhodane metode za ispitivanje kemikalija različitih fizikalno-kemijskih svojstava, uključujući hlapive spojeve.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Test povratnih mutacija na bakterijama *Salmonella typhimurium* ili *Escherichia coli* otkriva mutacije kod sojeva kojima je potrebna aminokiselina (histidin odnosno triptofan) za stvaranje sojeva koji ne ovise egzogenoj opskrbi aminokiselinom.

Mutageni supstitucije baznih parova su agensi koji uzrokuju zamjenu baza DNK. Kod testa povratnih mutacija ova se zamjena u bakterijskom genomu može javiti na mjestu izvorne mutacije ili na nekom drugom mjestu.

Frameshift mutageni (mutageni pomaka očitavanja) su agensi koji uzrokuju adiciju ili deleciju jednog ili više baznih parova u DNK, mijenjenjući na taj način okvir očitavanja RNK.

▼B

1.3. UVODNA RAZMATRANJA

Kod bakterijskog testa povratnih mutacija koriste se prokariotske stanice, koje se razlikuju od stanica sisavaca po faktorima kao što su unos, metabolizam, struktura kromosoma i procesi popravljanja DNK. *In vitro* testovi općenito zahtijevaju upotrebu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Sustavi metaboličke aktivacije *in vitro* ne mogu u potpunosti oponašati *in vivo* uvjete kod sisavaca. Prema tome, ovaj test ne pruža izravne informacije o mutagenom i karcinogenom potencijalu tvari s obzirom na sisavce.

Bakterijski test povratnih mutacija obično se koristi kao inicijalni probir za genotoksičko djelovanje i posebno za djelovanje koje uzrokuje točkaste mutacije. Obimna baza podataka dokazuje da mnoge kemikalije koje su pozitivne na ovaj test pokazuju mutageno djelovanje i u drugim testovima. Postoje primjeri mutagenih agensa koje ovaj test ne otkriva; razlozi za taj nedostatak mogu se pripisati specifičnoj prirodi krajnjeg učinka koji se otkriva, razlike u metaboličkoj aktivaciji ili razlike u bioraspoloživosti. S druge strane, faktori koji pojačavaju osjetljivost bakterijskog testa povratnih mutacija mogu dovesti do precjenjivanja mutagenog djelovanja.

Bakterijski test povratnih mutacija možda nije pogodan za ocjenjivanje nekih klasa kemikalija kao što su spojevi s jakim baktericidnim djelovanjem (npr. neki antibiotici) i spojevi koji posebno utječu na sustav razmnožavanja stanica sisavaca (npr. neki inhibitori topoizomeraze i neki nukleozidni analozi). U takvim slučajevima mogli bi biti prikladniji testovi mutacija koji se provode na sisavcima.

Iako su se mnogi spojevi koji su pozitivni na ovaj test pokazali karcinogenima za sisavce, ova korelacija nije apsolutna. Ona ovisi o kemijskoj klasi, a postoje i karcinogeni koje ovaj test ne otkriva jer djeluju preko drugih, negenotoksičkih mehanizama ili mehanizama kojih u bakterijskim stanicama nema.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Suspenzije bakterijskih stanica izlažu se ispitivanoj tvari uz prisutnost ili odsutnost egzogenog sustava metaboličke aktivacije. Kod metode inkorporacije u agarnu ploču, te se suspenzije pomiješaju s top agarom i razliju izravno na minimalnu podlogu. Kod metode predinkubacije mješavina za tretiranje najprije se inkubira i potom pomiješa s top agarom, prije razlijevanja na minimalnu podlogu. Kod obje tehnike, nakon dva ili tri dana inkubacije, prebroje se kolonije revertanata (mutanti dobiveni povratnom mutacijom) i uspoređuju s brojem kolonija spontanih revertanata na kontrolnim pločama s otapalom.

Opisano je više postupaka za izvođenje bakterijskog testa povratne mutacije. Među onima koji se obično koriste su metoda inkorporacije u agarnu ploču (1)(2)(3)(4), metoda predinkubacije (2)(3)(5)(6)(7)(8), metoda fluktuacije (9)(10) i metoda suspenzije (11). Opisane su i prilagodbe za ispitivanje plinova ili para (12).

▼B

Postupci opisani u ovoj metodi odnose se prvenstveno na metode inkorporacije i predinkubacije. Obje su prihvatljive za izvođenje pokusa sa i bez metaboličke aktivacije. Neke se tvari mogu lakše otkriti primjenom metode predinkubacije. Te tvari spadaju u klase kemikalija koje uključuju kratkolančane alifatske nitrozamine, dvovalentne metale, aldehide, azo-bojila i diazo spojeve, pirolizidinske alkaloide, alilne spojeve i nitro spojeve (3). Priznaje se da neke klase mutagena nije uvijek moguće otkriti standardnim postupcima kao što su metoda inkorporacije u agarnu ploču ili metoda predinkubacije. Njih treba smatrati „posebnim slučajevima" i čvrsto se preporučuje da se za njihovo otkrivanje primijene alternativni postupci. U takve „posebne slučajeve" mogu se svrstati (zajedno s primjerima postupaka koji se mogu upotrijebiti za njihovo otkrivanje): azo-bojila i diazo spojevi (3)(5)(6)(13), plinovi i hlapive kemikalije (12)(14)(15)(16) i glikozidi (17)(18). Odstupanja od standardnog postupka treba znanstveno opravdati.

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Priprema**

1.5.1.1. *Bakterije*

Svježe kulture bakterija treba uzgojiti do kasne eksponencijalne ili rane stacionarne faze rasta (oko 10^9 stanica na ml). Kulture u kasnoj stacionarnoj fazi ne treba koristiti. Bitno je da kulture upotrijebljene u pokusu sadrže visoki titar živih bakterija. Taj se titar može utvrditi ili na temelju kontrolnih podataka o krivuljama rasta iz ranijih ispitivanja ili na temelju svakog ispitivanja kod kojega se utvrđuje broj živih stanica u kulturama uzgojenim na agarnim pločama.

Preporučena temperatura inkubacije je 37 °C.

Treba upotrijebiti najmanje pet sojeva bakterija. Oni trebaju uključivati četiri soja *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 ili TA97a ili TA97; TA98 i TA100) koji su u laboratorijskoj praksi pokazali da su pouzdani i da su njihove reakcije ponovljive. Ta četiri soja *S. typhimurium* imaju na primarnom mjestu povratne mutacije bazne parove GC i poznata je mogućnost da oni neće pokazati neke oksidirajuće mutagene, agense koji stvaraju poprečne veze i hidrazine. Takve tvari mogu se otkriti pomoću sojeva *E.coli* WP2 ili *S. typhimurium* TA102 (19) koji na primarnom mjestu povratne mutacije imaju bazni par AT. Prema tome, preporučena kombinacija sojeva je:

— *S. typhimurium* TA1535, i

— *S. typhimurium* TA1537 ili TA97 ili TA97a, i

— *S. typhimurium* TA98, i

— *S. typhimurium* TA100, i

— *E. coli* WP2 uvrA, ili *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ili *S. typhimurium* TA102.

Da bi se otkrili mutageni koji stvaraju poprečne veze, možda bi bilo bolje uključiti TA102 ili dodati soj *E. coli* koji ima sposobnost popravljanja DNA (npr. *E. coli* WP2 ili *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Treba koristiti utvrđene postupke za pripravljanje matičnih kultura, provjeru markera i pohranjivanje. Za svaki pripravak liofilizirane matične kulture treba dokazati da je toj kulturi za rast potrebna aminokiselina (histidin za sojeve *S. typhimurium* i triptofan za sojeve *E. coli*). Slično treba provjeriti i druge fenotipske karakteristike, na primjer: prisutnost ili odsutnost r-plazmida, tamo gdje je to primjereno (tj. otpornost na ampicilin kod sojeva TA98, TA100 i TA97a ili TA97, WP2 uvrA i WP2 uvrA (pKM101), te otpornost na ampicilin + tetraciklin kod soja TA 102G); prisutnost karakterističnih mutacija (tj. rfa mutacije kod *S. typhimurium* kroz osjetljivost na kristal ljubičasto i uvrA mutacije kod *S. typhimurium* ili uvrB mutacije kod *S. typhimurium* kroz osjetljivost na ultraljubičasto svjetlo) (2)(3). Ti sojevi također trebaju proizvesti broj kolonija spontanih revertanata (spontanih povratnih mutanata) u okvirima učestalosti koja se očekuje na temelju kontrolnih podataka iz prijašnjih ispitivanja i po mogućnosti unutar okvira navedenih u literaturi.

1.5.1.2. *Hranjiva podloga*

Koristi se odgovarajući minimalni agar (npr. koji sadrži Vogel-Bonnerovu minimalnu podlogu E i glukozu) i top agar koji sadrži histidin i biotin ili triptofan, koji omogućuju nekoliko staničnih dioba (1)(2)(9).

1.5.1.3. *Metabolička aktivacija*

Bakterije treba izložiti ispitivanoj tvari uz prisutnost i uz odsutnost odgovarajućeg metaboličkog aktivacijskog sustava. Najčešće upotrebljavani sustav je postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9) pripravljena od jetre glodavaca tretiranih agensima za enzimsku indukciju, kao što su Aroclor 1254 (1)(2), ili kombinacija fenobarbitona i β-naftoflavona (18)(20)(21). Postmitohondrijska frakcija obično se upotrebljava u koncentracijama od 5 do 30 % v/v u mješavini S9. Izbor i stanje sustava mataboličke aktivacije može ovisiti o klasi opasnosti kemikalije koja se testira. U nekim slučajevima može biti primjereno upotrijebiti više od jedne koncentracije postmitohondrijske frakcije. Za azo-bojila i diazo spojeve možda je primjerenija upotreba redukcijskog sustava metaboličke aktivacije (6)(13).

1.5.1.4. *Ispitivana tvar/priprema*

Krute ispitivane tvari treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima i prema potrebi razrijediti prije tretiranja bakterija. Tekuće ispitivane tvari mogu se izravno dodati u ispitne sustave i/ili razrijediti prije tretiranja. Treba koristiti svježe preparate ispitivane tvari, osim ako podaci o njihovoj stabilnosti dokazuju da je njihovo pohranjivanje prihvatljivo.

Ne smije postojati sumnja da bi otapalo/nosač s ispitivanom tvari moglo/mogao proizvesti kemijsku reakciju i treba biti pogodno/pogodan za preživljavanje bakterija i djelovanje S9 (22). Ako se koriste otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje treba potkrijepiti referentnim podacima koji dokazuju njihovu prikladnost. Preporuka je da se, kad god je to moguće, najprije razmotri mogućnost upotrebe vodenog otapala/nosača. Kad se ispituju tvari koje u vodi nisu stabilne, korištena organska otapala ne smiju sadržavati vodu.

▼B

1.5.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.5.2.1. *Pokusni sojevi (vidjeti 1.5.1.1.)*

1.5.2.2. *Koncentracije izlaganja*

Među kriterijima koje treba uzeti u obzir kod utvrđivanja najveće količine tvari koja će se koristiti su citotoksičnost i topljivost u konačnoj mješavini za tretiranje.

Može biti korisno toksičnost i netopljivost utvrditi preliminarnim pokusom. Citotoksičnost se može otkriti po smanjenju broja kolonija revertanata, po čistim dijelovima ili smanjenju površine podloge, ili po stopi preživljavanja tretiranih kultura. Citotoksičnost tvari može se promijeniti uz prisutnost sustava metaboličke aktivacije. Netopljivost se može ocijeniti kao talog u konačnoj mješavini u stvarnim ispitnim uvjetima koji je vidljiv prostim okom.

Preporučena maksimalna ispitna koncentracija za topljive necitotoksične tvari je 5 mg/ploča ili 5µl/ploča. Za necitotoksične tvari koje nisu topljive pri koncentraciji od 5 mg/ploča ili 5µl/ploča, jedna ili više testiranih koncentracija treba biti netopljiva u konačnoj mješavini za tretiranje. Ispitivane tvari koje su citotoksične već pri koncentracijama ispod 5 mg/ploča ili 5µl/ploča treba testirati do citotoksične koncentracije. Talog ne smije smetati očitavanju.

Za inicijalni pokus treba koristiti najmanje pet različitih koncentracija ispitivane tvari koje je moguće analizirati, s intervalima od približno pola log (tj. √10) između ispitnih točaka. Manji intervali mogu biti primjereni kad se istražuje ovisnost između koncentracija i reakcija. Kad se ocjenjuju tvari koje sadrže značajne količine potencijalno mutagenih nečistoća može se razmotriti mogućnost testiranja s koncentracijama viši od 5 mg/ploča ili 5 µl/ploča.

1.5.2.3. *Negativne i pozitivne kontrole*

U svaki pokus treba uključiti paralelne pozitivne i negativne kontrole (otapalo ili nosač), specifične za određene sojeve, sa i bez metaboličke aktivacije. Treba odabrati koncentracije pozitivnih kontrola koje dokazuju učinkovitost izvedbe svakog pokusa.

Kod pokusa kod kojih se koristi sustav metaboličke aktivacije, referentna(-e) tvar(-i) treba odabrati na temelju bakterijskih sojeva koji se koriste.

Sljedeće tvari su primjeri odgovarajućih pozitivnih kontrola za pokuse s metaboličkom aktivacijom:

CAS broj	EINECS broj	Naziv tvari
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenz [α]antracen
50-32-8	200-028-5	benzo[a]piren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracen

▼B

CAS broj	EINECS broj	Naziv tvari
50-18-0		ciklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamid monohidrat

Sljedeća tvar je odgovarajuća pozitivna kontrola za metodu redukcijske metaboličke aktivacije:

CAS broj	EINECS broj	Naziv tvari
573-58-0	209-358-4	kongo crvenilo

2-aminoantracen ne treba koristiti kao jedini pokazatelj učinkovitosti mješavine S9. Ako se koristi 2-aminoantracen, svaku šaržu S9 isto tako treba okarakterizirati pomoću mutagena kojemu je potrebna metabolička aktivacija mikrosomskim enzimima, npr. benzo[a]piren, dimetilbenzantracen.

Sljedeće tvari su primjeri pozitivnih kontrola specifičnih za određene sojeve, za pokuse koji se izvode bez egzogenog sustava metaboličke aktivacije:

CAS brojevi	EINECS brojevi	Naziv tvari	Soj
26628-22-8	247-852-1	natrijev azid	TA 1535 i TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridin	TA 1537, TA 97 i TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 i TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumen hidroperoksid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicin C	WP2 uvrA i TA l02
70-25-7	200-730-1	N-metil-N-nitro-N-nitrozogvanidin	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrokinolin-1-oksid	WP2, WP2uvrA in WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furilfuramid (AF2)	tvari koje sadrže plazmide

Mogu se koristiti i druge odgovarajuće referentne tvari pozitivne kontrole. Treba razmotriti mogućnost upotrebe kontrolnih kemikalija svrstanih u istu klasu opasnosti kao ispitivana tvar, ako su takve kemikalije raspoložive.

Treba koristiti i negativne kontrole koje se sastoje samo od otapala ili nosača, bez ispitivane tvari, s kojima se inače postupa jednako kao s tretiranim skupinama. Osim toga treba koristiti i netretirane kontrole osim ako postoje podaci o kontrolama iz ranijih pokusa koji dokazuju da odabrano otapalo ne izaziva nikakve štetne ili mutagene učinke.

▼B

1.5.3. **Postupak**

Kod metode inkorporacije u agarnu ploču (1)(2)(3)(4), bez metaboličke aktivacije, obično se pomiješa 0,05 ml ili 0,1 ml ispitne otopine, 0,1 ml svježe bakterijske kulture (koja sadrži približno 10^8 živih stanica) i 0,5 ml sterilnog pufera s 2,0 ml top agara. Kod pokusa s metaboličkom aktivacijom obično se 0,5 ml mješavine za metaboličku aktivaciju koja sadrži odgovarajuću količinu post-mitohondrijske frakcije (u rasponu od 5 do 30 % v/v u mješavini za metaboličku aktivaciju) pomiješa se s top agarom (2,0 ml), kao i s bakterijama i ispitivanom tvari/ispitnom otopinom. Sadržaj svake epruvete se promiješa i prelije po površini minimalne agarne podloge. Prije inkubacije top agar treba pustiti da se stvrdne.

Kod predinkubacijske metode (2)(3)(5)(6), uobičajeno je da se ispitivana tvar/ispitna otopina predinkubira zajedno s pokusnim sojem (oko 10^8 živih stanica) i sterilnim puferom ili sustavom za metaboličku aktivaciju (0,5 ml), obično 20 minuta ili duže na 30-37 °C, prije nego se pomiješa s top agarom i prelije po površini minimalne agarne podloge. Obično se 0,05 ml ili 0,1 ml ispitivane tvari/ispitne otopine, 0,1 ml bakterija i 0,5 ml mješavine S9 ili sterilnog pufera pomiješa s 2,0 ml top agara. Za vrijeme predinkubacije epruvete treba prozračivati pomoću tresilice.

Za adekvatnu procjenu varijacija, za svaku visinu doze treba nasaditi po tri ploče. Upotreba dviju ploča je prihvatljiva ako za to postoji znanstveno opravdanje. Ako se povremeno dogodi da se ploča izgubi, to ne mora nužno značiti da su rezultati pokusa nevažeći.

Plinovite ili hlapive tvari treba ispitivati odgovarajućim metodama, na primjer u nepropusnim posudama (12)(14)(15)(16).

1.5.4. **Inkubacija**

Sve ploče u određenom pokusu treba inkubirati 48-72 sata na 37 °C. Nakon inkubacije na svakoj se ploči utvrđuje broj kolonija revertanata.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA PODATAKA

Podatke treba prikazati kao broj kolonija revertanata po agarnoj ploči. Treba navesti i broj kolonija revertanata na agarnim pločama negativne kontrole (kontrolni uzorak tretiran otapalom i, ako se koristi, netretirani kontrolni uzorak) i pozitivne kontrole. Treba navesti ukupni broj na pojedinačnim pločama, srednju vrijednost broja kolonija revertanata po ploči i standardnu devijaciju za ispitivanu tvar kao i za pozitivne i negativne kontrole (netretirane i/ili kontrole tretirane otapalom).

Potvrđivanje jasne pozitivne reakcije nije potrebno. Nejasne rezultate treba pojasniti daljnjim ispitivanjima, po mogućnosti uz modifikaciju uvjeta ispitivanja. Negativne rezultate treba potvrđivati od slučaja do slučaja. Kad se smatra da potvrda negativnih rezultata nije potrebna, takvo mišljenje treba znanstveno opravdati. U daljnjim pokusima treba razmotriti mogućnost modifikacije ispitnih parametara kako bi se povećao broj uvjeta koji će se analizirati. Ispitni parametri koji se mogu modificirati uključuju vremenske razmake između primjene različitih koncentracija, metode tretiranja (inkorporacija u ploču ili predinkubacija u tekućini) i uvjete metaboličke aktivacije.

▼B

2.2. OCJENA I TUMAČENJE REZULTATA

Ima više kriterija za utvrđivanje pozitivnih rezultata, kao što je povećanje broja kolonija revertanata vezano uz koncentraciju unutar ispitivanog raspona i/ili ponovljivi porast pri jednoj ili više koncentracija po ploči, kod najmanje jednog soja, sa ili bez sustava za metaboličku aktivaciju (23). Najprije treba razmotriti biološku relevantnost rezultata. Kao pomoć pri ocjenjivanju rezultata ispitivanja mogu se koristiti statističke metode (24). Međutim, statistički značaj ne smije biti jedini odlučujući faktor za utvrđivanje pozitivne reakcije.

Kod ovog se testa smatra da ispitivana tvar kod koje rezultati ne udovoljavaju gore navedenim kriterijima nije mutagena.

Iako će većina pokusa dati jasne pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima dobiveni podaci neće omogućiti donošenje definitivne ocjene o djelovanju ispitivane tvari. Rezultati mogu ostati nejasni ili upitni bez obzira na broj ponavljanja pokusa.

Pozitivni rezultati testa povratnih mutacija znače da tvar uzrokuje točkaste mutacije zamjenom baza ili pomakom okvira očitavanja u genomu bakterije *Salmonella typhimurium* i/ili *Escherichia coli*. Negativni rezultati znače da, u uvjetima pokusa, ispitivana tvar nije mutagena za pokusnu vrstu.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

Otapalo/nosač:

— obrazloženje za odabir otapala/nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane tvari u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Sojevi:

— upotrijebljeni sojevi,

— broj stanica po kulturi,

— karakteristike soja.

Uvjeti ispitivanja:

— količina ispitivane tvari po ploči (mg/ploča ili µl/ploča) kao i razlozi za odabir doze i broja ploča za svaku koncentraciju,

— upotrijebljene hranjive podloge,

— vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije, uključujući kriterije prihvatljivosti,

— postupci tretiranja.

Rezultati:

— znakovi toksičnosti,

— znakovi taloženja,

— ukupan broj na pojedinačnim pločama,

▼B

— srednji broj kolonija revertanata po ploči i standardna devijacija,

— ovisnost doze i reakcije, tamo gdje je moguće,

— statističke analize, ako su rađene,

— podaci o istovremenim negativnim (otapalo/nosač) i pozitivnim kontrolama, s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama,

— podaci o negativnim (otapalo/nosač) i pozitivnim kontrolama iz prijašnjih ispitivanja, s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, str. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, str. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E., (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, str. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V., (1986) The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, str. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., (1975) Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, str. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M., (1980) Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. str. 273-285.

(7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R., (1980) Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, str. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L., (1987) Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, str. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A., (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, str. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984) The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, str. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J., (1981) An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, str. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994) Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, str. 335-344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L., (1984) Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, str. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K., (1992) Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, str. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G., (1977) Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, str. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D., (1987) Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, str. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T., (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, str. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N., (1980) Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, str. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G., (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, str. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: „*In vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, str. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, str. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N., (1981) Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., str. 88343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E., (1987) Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, str. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J., (1989) Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, str. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje 476 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i dobrobit životinja. U trenutačnoj revidiranoj verziji ispitne metode B.17. uzima se u obzir gotovo 30 godina iskustva s ovim ispitivanjem te je ona rezultat razvoja posebne nove metode namijenjene *in vitro* ispitivanjima genskih mutacija stanica sisavaca upotrebom gena za timidin kinazu. Ispitna metoda B.17. dio je niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).

2. Svrha je *in vitro* ispitivanja genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u tim ispitivanjima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije na genu za endogenu hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (Hprt kod stanica glodavaca, HPRT kod ljudskih stanica; u ovoj se ispitnoj metodi zajednički nazivaju gen Hprt i HPRT test) i transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (gpt) (dalje u tekstu „XPRT test”). Testovi mutacija HPRT i XPRT otkrivaju različite spektre genetskih pojava. Uz mutacije otkrivene HPRT testom (npr. supstitucije baznih parova, pomaci okvira očitavanja, manje delecije i insercije), autosomalna lokacija transgena gpt može omogućiti otkrivanje mutacija koje su rezultat velikih delecija i moguće mitotske rekombinacije koja nije otkrivena HPRT testom jer se gen Hprt nalazi na X-kromosomu (2., 3., 4., 5., 6. i 7.). XPRT se trenutačno upotrebljava manje nego HPRT test u regulatorne svrhe.

3. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.

5. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi doveli do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani izravnom interakcijom ispitivanih kemikalija i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (8., 9. i 10.), interakciju s komponentama medija (11. i 12.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (13.). Citotoksičnost koja premašuje preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 19., smatra se prekomjernom za HPRT test.

▼M8

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

NAČELO ISPITIVANJA

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

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

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

9. Vrste stanica koje se koriste u testovima HPRT i XPRT trebale bi imati dokazanu osjetljivost na kemijske mutagene, visoku učinkovitost kloniranja, stabilan kariotip i stabilnu učestalost pojave spontanih mutanata. Stanice koje se najčešće upotrebljavaju za HPRT test uključuju linije stanica kineskog hrčka CHO, CHL i V79, stanice limfoma miša L5178Y te stanice ljudskih limfoblastoidnih stanica TK6 (18. i 19.). Za XPRT test upotrebljavaju se stanice AS52 dobivene od stanica CHO koje sadržavaju transgen gpt (i kod kojih je izbrisan gen Hprt) (20. i 21.); HPRT test ne može se provesti na stanicama AS52 jer je izbrisan gen hprt. Uporaba drugih staničnih linija trebala bi se opravdati i validirati.

10. Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broja kromosoma staničnih linija te odsustvo kontaminacije mikoplazmom (22. i 23.), a stanice ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je promijenjen modalni broj kromosoma. Treba utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa koje se upotrebljava u ispitnom laboratoriju i ono treba biti u skladu

▼M8

s objavljenim značajkama stanica. Trebalo bi provjeriti i učestalost pojave spontanih mutanata u glavnoj zalihi stanica te zalihu ne bi trebalo upotrebljavati ako učestalost pojave mutanata nije prihvatljiva.

11. Prije upotrebe u ovom ispitivanju iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje već postoje, npr. uzgojem u HAT mediju za HPRT test i MPS mediju za XPRT test (5. i 24.) (vidjeti Dodatak 1.). Te pročišćene stanice mogu se krioprezervirati i zatim odmrznuti za uporabu kao radni uzorci. Radni uzorak koji se odmrzne može se upotrebljavati za ispitivanje nakon što se dosegne normalno vrijeme dupliciranja. Pri provedbi XPRT testa za rutinsku kulturu stanica AS52 trebali bi se primjenjivati uvjeti kojima se osigurava održavanje transgena gpt (20.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

12. Za održavanje kultura trebalo bi primjenjivati prikladne uvjete za medije za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO_2 i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete medija i kultura kojima se osiguravaju optimalni rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i optimalna učinkovitost kloniranja kako mutiranih tako i nemutiranih stanica.

Priprema kultura

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

Metabolička aktivacija

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

Priprema ispitivane kemikalije

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

▼M8

ISPITNI UVJETI

Otapala

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

Mjerenje citotoksičnosti i odabir koncentracija izlaganja

17. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 20.), taloženje u mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 21.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 5.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.

18. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 20.–22.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica, u usporedbi s prilagođenom učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).

19. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz više neovisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (17.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, odabranim bi ispitnim koncentracijama trebalo obuhvatiti raspon od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost do koncentracija pri kojima je citotoksičnost umjerena, niska ili nepostojeća. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili podrobno istraživanje odnosa koncentracije i odgovora možda biti potrebno

▼M8

upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 43.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kad se upotrebljava jedna kultura.

20. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebala bi se nastojati ostvariti relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 %. Trebalo bi s oprezom tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo pri relativnoj stopi preživljavanja od 10 % ili manjoj (stavak 43.).

21. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.

22. Ako nisu zapaženi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (39. i 40.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijskim tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvarima) (41.), proizvodima ekstrahiranima iz okoliša itd., možda će trebati povećati najvišu koncentraciju (npr. 5 mg/ml), u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (42.).

Kontrole

23. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 16.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao kulture za tretiranje.

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

▼M8

Tablica 1.

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

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

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

25. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisutnost i odsutnost sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do šest sati).

26. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasažirati dovoljno stanica kako bi se održalo deset spontanih mutacija u svakoj kulturi u svim fazama ispitivanja (17.). Učestalost pojave spontanih mutanata općenito iznosi od 5 do 20×10^{-6}. Kako bi se postigla učestalost pojave spontanih mutanata od 5×10^{-6} i kako bi se održao dovoljan broj spontanih mutacija (10 ili više) čak i za kulture koje se tretiraju pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %), bilo bi potrebno tretirati najmanje 20 × 106 stanica. Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica (ali nikad manje od dva milijuna) tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (17.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje učestalosti pojave mutanata

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

▼M8

Osposobljenost laboratorija

28. Kako bi steklo dovoljno iskustva u izvođenju ispitivanja prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (upotrebom različitih otapala/nosača). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. To se ne primjenjuje na laboratorije koji već imaju iskustva, tj. one koji imaju bazu podataka o prijašnjim ispitivanjima kako je utvrđeno u stavcima od 30. do 33.

29. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1. u stavku 25.) trebao bi se ispitati u odsutnosti i prisutnosti metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje učinkovitosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

30. Laboratorij bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).

31. Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama (22.). Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (17., 45. i 46.).

32. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, ali bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami (47.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama te dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (46.). Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prijašnje podatke (npr. kriteriji za uključivanje podataka u prijašnje podatke i njihovo izuzimanje iz tih podataka te kriteriji prihvatljivosti za određeni pokus) nalaze se u literaturi (45.).

33. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 23. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama koji se nalaze u bazi podataka laboratorija (17., 45. i 46.). Ako se podaci o istodobnim negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti prethodno navedeno) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.

▼M8

34. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

35. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati sve podatke koji su potrebni za izračun citotoksičnosti (izraženo kao relativna stopa preživljavanja). Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati broj stanica na kraju tretiranja, broj stanica nasađenih odmah nakon tretiranja i brojeve kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama). Relativna stopa preživljavanja za svaku kulturu trebala bi se izraziti kao postotak u odnosu na istodobnu kontrolu s otapalom (definicije potražiti u Dodatku 1.).

36. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati i sve podatke koji su potrebni za izračun učestalosti pojave mutanata. Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati: (1) broj stanica nasađenih sa selektivnim agensom i bez njega (kad se stanice nasađuju radi selekcije mutanata) i (2) broj izbrojanih kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama) na pločama sa selektivnim agensom i bez njega. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata (na pločama sa selektivnim agensom) koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja (s ploča bez selektivnog agensa). Učestalost pojave mutanata trebala bi se izraziti kao broj mutiranih stanica po milijunu vijabilnih stanica (definicije potražiti u Dodatku 1.).

37. Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tablice.

Kriteriji prihvatljivosti

38. Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:

— smatra se da je istodobnu negativnu kontrolu prihvatljivo dodati u bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija kako je opisano u stavku 33.,

— istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 24.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s odgovorima generiranima u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— ispitana su dva pokusna uvjeta (tj. s metaboličkom aktivacijom i bez nje) osim ako je jedan doveo do pozitivnog rezultata (vidjeti stavak 25.),

— odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 25., 26. i 19.),

— kriteriji za odabir najviše koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 20., 21. i 22.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

39. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta:

▼M8

— najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji zapaženo je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom,

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

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

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

— ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,

— svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 33.).

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

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

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

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

Izvješće o ispitivanju

44. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

▼**M8**

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Otapalo:

— obrazloženje odabira otapala,

— postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

Za laboratorijske glavne kulture:

— vrsta, izvor staničnih linija,

— broj pasaža, ako je dostupan, i povijest laboratorija,

— kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,

— metode održavanja staničnih kultura,

— odsustvo mikoplazme,

— vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

— obrazloženje za odabir koncentracija i broja kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,

— sastav medija, koncentracija CO_2, razina vlažnosti,

— koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),

— koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,

— temperatura inkubacije,

— vrijeme inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— gustoća stanica za vrijeme tretiranja,

— vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9), tvari pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,

▼M8

— duljina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasađenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),

— identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,

— kriteriji prihvatljivosti ispitivanja,

— metode korištene za utvrđivanje broja vijabilnih i mutiranih stanica,

— metode mjerenja citotoksičnosti,

— sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,

— trajanje inkubacije nakon nasađivanja,

— kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,

— metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

— broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,

— mjerenja citotoksičnosti i druga opažanja, ako postoje,

— znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,

— broj stanica nasađenih na selektivni i neselektivni medij,

— broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama (s otapalom) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),

— podaci o prijašnjim negativnim kontrolama (s otapalom) i prijašnjim pozitivnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, interval pouzdanosti (npr. 95 %) te broj podataka,

— statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.

2. Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

3. Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., SAD, 61, 1306.–1312.

4. Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394.–403.

5. Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/ XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121.–128.

6. Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235.–239.

7. Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17.–36.

8. Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147.–204.

9. Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297.–305.

10. Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789.–886.

11. Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439.–452.

12. Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177.–183.

13. Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 584, 1.–256.

14. Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135.–141.

15. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9.–17.

16. Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133.–147.

▼**M8**

17. Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, str. 66.–101.

18. Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193.–214.

19. Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165.–175.

20. Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411.–1415.

21. Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616.–9620.

22. Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).

23. Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261.–287.

24. Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299.–305.

25. Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83.–90.

26. Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365.–373.

27. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347.–364.

28. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

29. Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175.–177.

30. Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.

▼**M8**

31. Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55.–65.

32. Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51.–59.

33. UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupno na: [http://www.pops.int.html].

34. Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147.–156.

35. O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7.–18.

36. Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7.–18.

37. Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. U: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, str. 91.–103.

38. Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5, 795.–801.

39. OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj.

40. Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36.–43.

41. EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

42. USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Dostupno na: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

43. O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109.–118.

44. Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121–8.

▼**M8**

45. Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87.–90.

46. OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Pariz.

47. Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, str. 141.–154.

48. Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M8**

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

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

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

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

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

▼M8

Dodatak 2.

FORMULE ZA PROCJENU CITOTOKSIČNOSTI I UČESTALOSTI POJAVE MUTANATA

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

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

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

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

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

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

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

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče:

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

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče s mikrojažicama:

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

učinkovitost kloniranja = -LnP(0) / broj nasađenih stanica po jažici,

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

LnP(0) = -Ln (broj praznih jažica / broj jažica u koje su nasađene stanice);

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. ***IN VITRO*** **TESTOVI TRANSFORMACIJA STANICA SISAVACA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJA

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Sustavi kultura stanica sisavaca mogu se koristiti za otkrivanje fenotipskih promjena *in vitro* izazvanih kemijskim tvarima koje su povezane s malignim transformacijama *in vivo*. Najčešće se koriste stanice C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, te stanice štakora soja Fischer, a testovi se temelje na promjenama u staničnoj morfologiji, formiranju fokusa (guste nakupine stanica koje su izgubile kontaktnu inhibiciju) ili promjenama u ovisnosti rasta stanica o tvrdoj podlozi za prihvaćanje u polukrutom agaru (u kojem inače ne bi rasle). Nijedan od konačnih učinaka *in vitro* testa nema utvrđenu mehanističku vezu s karcinomom. Neki od ispitnih sustava mogu otkriti promotore tumora. Citotoksičnost se može utvrditi mjerenjem učinka ispitnog materijala na sposobnost stvaranja kolonija (učinkovitost kloniranja) ili na brzinu rasta kultura. Mjerenjem citotoksičnosti treba utvrditi je li izlaganje ispitivanoj kemikaliji bilo toksikološki relevantno, ali se ono ne može upotrijebiti za izračunavanje transformacije učestalosti kod svih analiza s obzirom da neke od njih mogu uključivati produženu inkubaciju i/ili ponovno nasađivanje na agarne ploče.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

Priprema

Stanice

Ovisno o testu transformacije koji se provodi, raspoloživ je čitav niz različitih staničnih linija ili primarnih stanica. Ispitivač se mora pobrinuti da u testu koji se obavlja stanice pokažu odgovarajuće fenotipske promjene nakon izlaganja poznatim karcinogenima i da za valjanost i pouzdanost testa koji se provodi u laboratoriju ispitivača postoje dokumentirani dokazi.

Hranjiva podloga

Treba primjenjivati hranjive podloge i pokusne uvjete koji odgovaraju analizi transformacija koja se primjenjuje.

▼B

Ispitivana tvar

Ispitivane tvari mogu se pripremiti u hranjivoj podlozi za uzgoj kultura, odnosno otopiti ili suspendirati u odgovarajućim nosačima prije tretiranja stanica. Konačna koncentracija nosača u sustavu kulture ne smije utjecati na sposobnost preživljavanja stanica, brzinu rasta ili pojavu transformacija.

Metabolička aktivacija

Stanice treba izlagati ispitivanoj tvari u prisutnosti i u odsutnosti odgovarajućeg sustava metaboličke aktivacije. Alternativno, u slučajevima korištenja staničnih tipova s endogenom (intrinzičnom) metaboličkom aktivnošću unaprijed treba biti poznato da ta aktivnost po svojoj prirodi odgovara klasi opasnosti u koju je svrstana kemikalija koja se ispituje.

Uvjeti ispitivanja

Primjena negativnih i pozitivnih kontrola

U svaki pokus treba uključiti pozitivne kontrole uz primjenu spojeva izravnog djelovanja, kao i spojeva kojima je potrebna metabolička aktivacija; isto tako treba primjenjivati i negativne kontrole (nosač).

Slijede primjeri tvari koje se mogu upotrijebiti kao pozitivne kontrole:

— Kemikalije izravnog djelovanja:

  — etilmetansulfonat.

  — β-propiolakton,

— Spojevi koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju:

  — 2-acetilaminofluoren,

  — 4-dimetilaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetilbenzantracen.

Prema potrebi u ispitivanje treba uključiti dodatnu pozitivnu kontrolu svrstanu u istu klasu kemikalija kao i spoj koji se ispituje.

Koncentracije izlaganja

Treba upotrijebiti nekoliko koncentracija ispitivane tvari. Navedene koncentracije trebaju prouzročiti toksički učinak razmjeran koncentraciji, pri čemu će pri najvišoj koncentraciji razina preživljavanja biti niska, dok će preživljavanje kod najniže koncentracije biti otprilike jednako onome koje izaziva negativna kontrola. Tvari koje su relativno netopljive u vodi treba ispitivati do granice njihove topljivosti, primjenjujući odgovarajuće postupke. Za netoksične tvari koje su lako topljive u vodi gornje koncentracije treba utvrđivati od slučaja do slučaja.

▼B

Postupak

Stanice se izlažu ispitivanoj tvari tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja, ovisno o ispitnom sustavu koji se primjenjuje, što u slučaju produženog izlaganja može uključivati i ponovljeno doziranje uz promjenu hranjive podloge (te, ako je potrebno, svježu mješavinu za metaboličku aktivaciju). Stanice bez dovoljne endogene (intrinzične) metaboličke aktivnosti treba izlagati ispitivanoj tvari u prisutnosti i odsutnosti odgovarajućeg sustava metaboličke aktivacije. Po završetku razdoblja izlaganja stanice se ispiru radi uklanjanja ostataka ispitivane tvari i kultiviraju u uvjetima koji pogoduju pojavljivanju transformiranog fenotipa koji se promatra, te se utvrđuje pojava transformacija. Svi se rezultati potvrđuju nezavisnim pokusom.

2. **PODACI**

Podatke treba prikazati u obliku tablice, što se može učiniti na više načina ovisno o provedenom ispitivanju, na primjer, može se navesti ukupan broj stanica, broj pozitivnih agarnih ploča, ili broj transformiranih stanica. Tamo gdje je to primjereno, razina preživljavanja iskazuje se u obliku postotka kontrolnih razina, a učestalost transformacija kao broj transformanata (transformiranih stanica) u odnosu na broj preživjelih stanica. Podatke treba ocijeniti uz primjenu odgovarajućih statističkih metoda.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati sljedeće informacije:

— upotrijebljena vrsta stanica, broj staničnih kultura, metode održavanja staničnih kultura,

— uvjeti ispitivanja: koncentracija ispitivane tvari, upotrijebljeni nosač, vrijeme inkubacije, trajanje i učestalost tretiranja, gustoća stanica tijekom tretiranja, vrsta upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije, pozitivne i negativne kontrole, detaljan opis promatranog fenotipa, upotrijebljeni selektivni sustav (ovisno o slučaju), obrazloženje za odabir doze,

— metoda upotrijebljena za brojenje živih i transformiranih stanica,

— statistička ocjena,

— diskusija o rezultatima,

— tumačenje rezultata.

3.2. OCJENA I TUMAČENJE

Vidjeti Opći uvod, dio B.

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B.

▼M8

B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNIH LETALNIH GENA NA GLODAVCIMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 478 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzima se u obzir više od trideset godina iskustva s tim ispitivanjem i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim ispitivanjima toksičnosti kao što su razvojne studije ili studije reproduktivne toksičnosti ili genotoksičnosti; međutim, zbog njegovih ograničenja i upotrebe velikog broja životinja, ovo ispitivanje nije namijenjeno za upotrebu kao primarna metoda, već kao dodatna ispitna metoda koja se može upotrebljavati samo ako ne postoji alternativa za regulatorne zahtjeve. Kombiniranjem ispitivanja toksičnosti stvara se mogućnost da se u ispitivanjima toksičnosti ne upotrijebi mnogo životinja. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).

2. Svrha je ispitivanja dominantnih letalnih gena ispitati uzrokuju li kemikalije mutacije koje su posljedica kromosomskih aberacija zametnih stanica. Osim toga, ispitivanje dominantnih letalnih gena relevantano je za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametno tkivo ispitne životinje.

3. Mutacije dominantnih letalnih gena uzrokuju embrionalnu ili fetalnu smrt. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametne stanice ispitne životinje.

4. Test dominantnih letalnih gena koristan je kao potvrda pozitivnih rezultata ispitivanja u kojima se upotrebljavaju somatske *in vivo* krajnje točke te je relevantna krajnja točka za predviđanje rizika po ljude i rizika od genetskih bolesti koje se prenose zametnom lozom. Međutim, za taj je test potrebno mnogo životinja i sati rada; stoga je i vrlo skup te dugo traje. Budući da je spontana učestalost mutacija dominantnih letalnih gena prilično velika, osjetljivost testa za otkrivanje malih povećanja učestalosti mutacija općenito je ograničena.

5. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Ispitivanje se najčešće provodi na miševima (2., 3. i 4.), ali u određenim slučajevima mogu biti primjerene i druge vrste, kao što su štakori (5., 6., 7. i 8.), ako je to znanstveno opravdano. Dominantni letalni geni obično su rezultat velikih kromosomskih aberacija (strukturnih i numeričkih abnormalnosti) (9., 10. i 11.), ali ne mogu se isključiti genske mutacije. Mutacija

▼M8

dominantnih letalnih gena je mutacija do koje dolazi u zametnoj stanici automatski ili se fiksira nakon oplodnje u ranoj fazi embrija, a ne uzrokuje disfunkciju gamete, ali je smrtonosna za oplođeno jajašce ili embrij u razvoju.

7. Svaki se mužjak u odgovarajućim vremenskim intervalima uzastopno pari sa ženkama koje se prethodno nisu parile. Broj parenja nakon tretiranja ovisi o krajnjoj svrsi istraživanja dominantnih letalnih gena (stavak 23.) i trebao bi osigurati da se sve faze sazrijevanja zametnih stanica mužjaka ocijene u pogledu dominantnih letalnih gena (12.).

8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITIVANJA

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

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

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

OPIS METODE

Pripreme

Odabir životinjske vrste

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

▼M8

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

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

Priprema životinja

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

Priprema doza

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

Ispitni uvjeti

Otapalo/nosač

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

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Međutim, životinje pozitivnih kontrola nije potrebno tretirati istim putem izlaganja kao životinje koje primaju ispitivanu kemikaliju ili uzimati

▼M8

uzorke u svim intervalima parenja. Za tvari za pozitivnu kontrolu trebalo bi biti poznato da proizvode dominantne letalne gene u uvjetima koji se upotrebljavaju za ispitivanje. Izuzimajući tretiranje, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u tretiranim skupinama.

17. Doze tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi se odabrati tako da proizvode slabe ili umjerene učinke kojima se kritički procjenjuju uspješnost i osjetljivost ispitivanja, ali da dosljedno dovode do pozitivnih dominantno letalnih učinaka. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu i primjerene doze navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.

Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu

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

Negativne kontrole

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

POSTUPAK

Broj životinja

19. Svaki se mužjak u odgovarajućim unaprijed utvrđenim vremenskim intervalima (npr. u tjednim intervalima, stavci 21. i 23.) uzastopno pari, po mogućnosti s jednom ženkom koja se prethodno nije parila. Broj mužjaka po skupini treba unaprijed utvrditi kako bi bio dovoljan (u kombinaciji s brojem parenih ženki u svakom intervalu parenja) za osiguravanje statističke snage potrebne kako bi se otkrilo barem udvostručenje učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (stavak 44.)

20. Broj ženki po intervalu parenja isto treba unaprijed utvrditi izračunima statističke snage kako bi se omogućilo otkrivanje barem udvostručenja učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (tj. dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se ukupno dobilo najmanje 400 implantata) (20., 21., 22. i 23.) i tako da se očekuje najmanje jedan mrtvi implantat po jedinici analize (tj. skupini parenja po dozi) (24.).

▼M8

Razdoblje primjene i intervali parenja

21. Broj intervala parenja koji slijedi nakon tretiranja određen je režimom tretiranja i trebao bi osigurati ocjenjivanje svih faza sazrijevanja zametnih stanica mužjaka u pogledu induciranja dominantnih letalnih gena (12. i 25.). Kod jednog tretiranja u kojem se primjenjuje do pet dnevnih doza trebalo bi provesti osam (miševi) ili deset (štakori) parenja u tjednim intervalima nakon posljednjeg tretiranja. Kod primjene više doza broj intervala parenja može se smanjiti razmjerno produljenju razdoblja primjene, ali tako da se zadrži cilj ocjenjivanja svih faza spermatogeneze (npr. kod miševa su nakon 28-dnevnog izlaganja dovoljna samo četiri tjedna parenja kako bi se ocijenile sve faze spermatogeneze). Svi režimi tretiranja i parenja trebali bi biti znanstveno opravdani.

22. Ženke bi trebale ostati s mužjacima barem tijekom jednog ciklusa estrusa (npr. kod miševa i štakora jedan tjedan obuhvaća jedan ciklus estrusa). Ženke koje se nisu parile tijekom jednotjednog intervala mogu se upotrijebiti za sljedeći interval parenja. Ili dok ne dođe do parenja, što se utvrđuje na temelju prisutnosti sperme u vagini ili na temelju prisutnosti vaginalnog čepa.

23. Izlaganje i režim parenja koji se primjenjuju ovise o krajnjoj svrsi istraživanja dominantne letalnosti. Ako je cilj utvrditi inducira li određena kemikalija mutacije dominantnih letalnih gena automatski, tad bi prihvatljiva metoda bila izlaganje cijelog ciklusa spermatogeneze (npr. sedam tjedana kod miševa, 5–7 tretiranja tjedno) i jedno parenje na kraju ciklusa. Međutim, ako je cilj utvrditi vrstu zametnih stanica osjetljivu na induciranje dominantnih letalnih gena, prednost se daje jednom ili petodnevnom izlaganju nakon kojeg slijedi tjedno parenje.

Visine doza

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

25. Maksimalna podnošljiva doza ne smije negativno utjecati ni na uspjeh parenja (21.).

26. Ispitivane kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.

27. Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati

▼M8

raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Za netoksične kemikalije granična doza za razdoblje primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za razdoblja primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

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

Opažanja

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

Prikupljanje i obrada tkiva

30. Ženke se eutaniziraju u drugoj polovini gravidnosti, na 13. dan gestacije kod miševa i 14.–15. dan kod štakora. Maternice se pregledavaju s obzirom na dominantno letalne učinke kako bi se utvrdio broj implantata, živih i mrtvih embrija te žutih tijela.

31. Rog maternice i jajnici izlažu se kako bi se prebrojala žuta tijela, a fetusi se uklanjaju, broje i važu. Trebalo bi oprezno pregledati maternice kako bi se otkrile resorpcije koje mogu prikriti živi fetusi i kako bi se osiguralo da se nabroje sve resorpcije. Bilježi se fetalna smrtnost. Bilježi se i broj uspješno oplođenih ženki i ukupan broj implantacija, predimplantacijskih gubitaka i postimplantacijska smrtnost (uključujući rane i kasne resorpcije). Osim toga, vidljivi fetusi mogu se čuvati u Bouinovu fiksativu najmanje dva tjedna,

▼M8

nakon čega slijedi pregled kojim se utvrđuju velike vanjske deformacije (28.) kako bi se dobile dodatne informacije o reproduktivnim i razvojnim učincima ispitnog agensa.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

32. Podatke treba prikazati u obliku tablice iz koje se može vidjeti broj mužjaka koji su se parili, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultate svakog parenja, uključujući identifikacijsku oznaku svakog mužjaka i ženke, treba bilježiti pojedinačno. Za svaku ženku trebalo bi navesti interval parenja, visinu doze za tretirane mužjake i broj živih i mrtvih implantata.

33. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem omjera mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz tretirane skupine u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz kontrolne skupine s nosačem/otapalom.

34. Predimplantacijski gubitak računa se kao razlika između broja žutih tijela i broja implantata ili kao smanjenje prosječnog broja implantata po ženki u usporedbi s parenjima u kontrolnoj skupini. Ako su procijenjeni gubici prije implantacije, treba ih zabilježiti.

35. Čimbenik dominantne letalnosti procjenjuje se kao: (broj postimplantacijskih smrti / ukupan broj implantacija po ženki) × 100.

36. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 29.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.

— Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o prijašnjim negativnim kontrolama i podacima laboratorija o prijašnjim kontrolama, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).

— Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim pozitivnim kontrolama, ako je dostupno, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).

— Analiziran je odgovarajući ukupan broj implantata i doza (stavak 20.).

— Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 24. i 27.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

38. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupilo dovoljno podataka za analizu doze i odgovora.

▼M8

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

— ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,

— ako je povećanje povezano s dozom u najmanje jednom pokusnom uvjetu (npr. tjedni interval parenja) kad se ocjenjuje odgovarajućim testom, i

— ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

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

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

— ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, i

— ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

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

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

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

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

44. Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati mužjaka. Iako je moguće da podaci o broju (npr. broj implantata po ženki) mogu odgovarati Poissonovoj distribuciji i/ili da udjeli (npr. udio mrtvih implantata) mogu biti binomno distribuirani, ti su podaci često previše raspršeni (31.). U skladu s tim, u statističkoj analizi prvo bi se trebao primijeniti test za veću ili manju raspršenost upotrebom testa varijance kao što je Cochranov test binomne varijance (32.) ili Taroneov C(α) test za binomnu veću raspršenost (31. i 33.). Ako se ne otkrije odstupanje od binomne raspršenosti, trendovi udjela u svim visinama doza mogu se ispitati upotrebom Cochran-Armitageova testa trenda (34.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati upotrebom Fisherova egzaktnog testa (35.). Isto tako, ako se ne otkrije odstupanje od Poissonove raspršenosti,

▼M8

trendovi
u brojevima mogu se ispitati upotrebom Poissonove regresije (36.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati u kontekstu Poissonova modela upotrebom kontrasta u parovima (36.). Ako se otkrije znatno veća ili manja raspršenost, preporučuju se neparametarske metode (23. i 31.). One obuhvaćaju testove koji se temelje na rangovima, kao što su Jonckheere-Terpstraov test trenda (37.) i Mann-Whitneyjevi testovi (38.) za usporedbu u parovima s kontrolnom skupinom s nosačem/otapalom te testovi permutacija, ponovnog uzorkovanja i samonadopunjavanja (*bootstrap*) za trendove i usporedbe u parovima s kontrolnom skupinom (31. i 39.).

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

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

Izvješće o ispitivanju

47. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

Sažetak

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Priprema ispitivane kemikalije:

— obrazloženje za odabir nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,

▼M8

— priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,

— analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se provode.

Ispitne životinje:

— vrsta/soj te obrazloženje tog odabira,

— broj, dob i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— metoda jedinstvenog identificiranja životinja,

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

Ispitni uvjeti:

— podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),

— podaci iz istraživanja za određivanje raspona,

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— obrazloženje odabira načina primjene,

— metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni promatranje i vaganje životinje,

— metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— pojedinosti o obogaćivanju okoliša u kavezu,

— detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,

— metoda analgezije,

— metoda eutanazije,

▼M8

— postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,

— izvor i serijski brojevi sve opreme i reagensa (ako je primjenjivo),

— metode prebrojavanja dominantnih letalnih gena,

— režim parenja,

— metode korištene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja,

— vrijeme eutanazije,

— kriteriji za ocjenjivanje dominantno letalnih učinaka, uključujući žuta tijela, implantacije, resorpcije i predimplantacijske gubitke, žive implantate i mrtve implantate.

Rezultati:

— stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,

— tjelesna masa mužjaka tijekom razdoblja tretiranja i parenja,

— broj parenih ženki,

— odnos doze i odgovora, ako je to moguće,

— podaci o istodobnim i prijašnjim negativnim kontrolama s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,

— tablični podaci za svaku ženku (majku), uključujući: broj žutih tijela po ženki; broj implantacija po ženki; broj resorpcija i predimplantacijskih gubitaka po ženki; broj živih implantata po ženki; broj mrtvih implantata po ženki; težine fetusa,

— prethodno navedeni podaci sažeti za svako razdoblje parenja i dozu, s učestalostima pojave mutacija dominantnih letalnih gena,

— primijenjene statističke analize i metode.

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.

2. Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) str. 235.–334., Elsevier, Amsterdam.

3. Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173.–185.

▼**M8**

4. Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159.–167.

5. Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267.–270.

6. Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77.–74.

7. Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325.–329.

8. Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80.–85.

9. Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239.–249.

10. Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616.–624.

11. Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112.–129.

12. Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169.–172.

13. Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21.–27.

14. Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167.–180.

15. Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371.–378.

16. James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303.–314.

17. Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35.–40.

▼**M8**

18. Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143.–156.

19. Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, str. 129.–156.

20. Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19.–30.

21. Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313.–318.

22. Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124.–141.

23. Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277.–288.

24. Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353.–360.

25. Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417.–429.

26. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313.–319.

27. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

28. Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291.–306.

29. Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

30. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87.–90.

31. Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35.–58.

32. Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10:103. 417.–451.

▼**M8**

33. Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585.–590.

34. Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. U *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), str. 334.–336. John Wiley and Sons, New York.

35. Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

36. Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, poglavlja 14. i 17. McGraw-Hill, Boston.

37. Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133.–145.

38. Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.

39. Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

40. Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Kemikalija: tvar ili smjesa

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

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

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

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

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

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

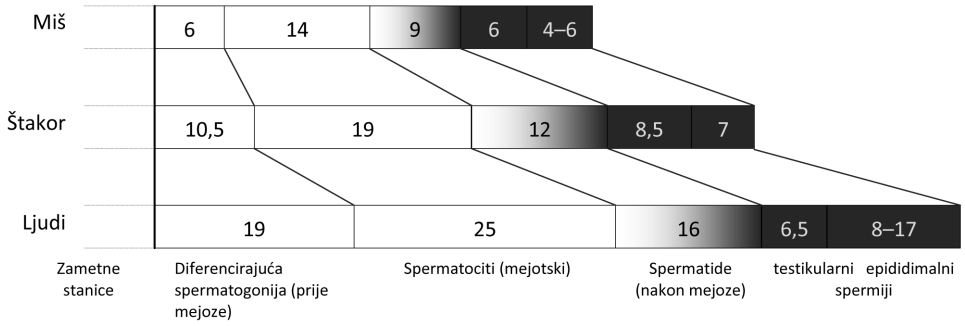
Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

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

▼**M8**

Dodatak 2.

TIJEK SPERMATOGENEZE U SISAVACA



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

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

Referentni dokumenti

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

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

▼M8

B.23. ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U SPERMATOGONIJAMA SISAVACA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 483 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzimaju se u obzir godine iskustva s tim testom i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim studijama toksičnosti ili genotoksičnosti. Kombiniranjem studija toksičnosti može se smanjiti broj životinja koje se upotrebljavaju u ispitivanjima toksičnosti. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).

2. Svrha je *in vivo* testa kromosomskih aberacija u spermatogonijama sisavaca utvrditi kemikalije koje uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u spermatogonijskim stanicama sisavaca (2., 3. i 4.). Osim toga, ovo je ispitivanje relevantno za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Ova ispitna metoda nije namijenjena mjerenju numeričkih abnormalnosti; test se ne upotrebljava rutinski u tu svrhu.

3. Ovim se ispitivanjem mjere strukturne kromosomske aberacije (i kromosomskog i kromatidnog tipa) u spermatogonijskim zametnim stanicama u fazi diobe te se stoga očekuje da se tim ispitivanjem može predvidjeti indukcija nasljednih mutacija u tim zametnim stanicama.

4. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

5. U ovom ispitivanju obično se upotrebljavaju glodavci, ali i druge vrste mogu biti prikladne u određenim slučajevima, ako je to znanstveno opravdano. Standardni citogenetski preparati sjemenika glodavaca daju mitotske (spermatogonije) i mejotske (spermatocit) metafaze. Mitotske i mejotske metafaze utvrđuju se na temelju morfologije kromosoma (4.). Ovim se *in vivo* citogenetskim testom otkrivaju strukturne kromosomske aberacije pri spermatogonijskoj mitozi. Druge ciljne stanice nisu predmet ove ispitne metode.

6. Kako bi se moglo otkriti aberacije kromatidnog tipa u spermatogonijskim stanicama, treba ispitati prvu mitotsku diobu stanica nakon tretiranja, prije nego što se te aberacije pretvore u aberacije kromosomskog tipa u kasnijim staničnim diobama. Dodatne informacije o tretiranim spermatocitima mogu se dobiti analizom strukturnih kromosomskih aberacija kod kromosoma tijekom mejoze u dijakinezi-metafazi I i metafazi II.

▼M8

7. U sjemeniku se nalaze brojne generacije spermatogonija (5.) i te različite vrste zametnih stanica mogu biti različito osjetljive na tretiranje kemikalijama. Prema tome, uočene aberacije predstavljaju skupnu reakciju tretiranih populacija spermatogonijskih stanica. Većinu mitotskih stanica u preparatima sjemenika čine spermatogonije tipa B, koje imaju stanični ciklus od približno 26 sati (3.).

8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITNE METODE

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

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

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

OPIS METODE

Pripreme

Odabir životinjske vrste

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

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

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

▼M8

Priprema životinja

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

Priprema doza

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

Ispitni uvjeti – otapalo/nosač

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

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Ako nije uključena istodobna pozitivna kontrolna skupina, u svaki pokus trebalo bi uključiti kontrole ocjenjivanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca). One se mogu dobiti uključivanjem u ocjenjivanje istraživanja prikladnih referentnih uzoraka koji su dobiveni i pohranjeni iz zasebnog pokusa s pozitivnom kontrolom koji se provodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci) u laboratoriju u kojem se provodi ispitivanje; na primjer, tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovito nakon toga, ako je potrebno.

17. Tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama iznad spontanih razina. Doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da učinci budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu navedeni su u tablici 1.

▼M8

Tablica 1.

Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu

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

Negativne kontrole

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

POSTUPAK

Broj životinja

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

Režim tretiranja

20. Ispitivane kemikalije obično se primjenjuju jednom (tj. kao jednokratno tretiranje); mogu se primjenjivati i drugi režimi doziranja uz uvjet da su znanstveno opravdani.

21. Kod skupine na koju se primjenjuje najviša doza uzorci se uzimaju dvaput nakon tretiranja. Budući da vrijeme potrebno za apsorpciju i metabolizam ispitivane kemikalije ili kemikalija, kao i njezino djelovanje na kinetiku staničnog ciklusa, mogu utjecati na optimalno vrijeme za otkrivanje kromosomskih aberacija, jedno se uzorkovanje obavlja ranije, a jedno kasnije, približno 24 sata i 48 sati nakon tretiranja. Kod ostalih doza ranije uzorke treba uzeti 24 sata nakon tretiranja (manje od trajanja staničnog ciklusa spermatogonija tipa B ili jednako tom trajanju, čime se poboljšava vjerojatnost ocjene prve metafaze nakon tretiranja), osim ako je poznato da je neko drugo vrijeme uzorkovanja primjerenije i opravdano.

22. Uzorci se mogu uzeti i u neko drugo vrijeme. Na primjer, u slučaju kemikalija koje imaju učinke neovisne o S-fazi, uzorkovanja može biti primjereno obaviti ranije (tj. u razdoblju kraćem od 24 sata).

▼M8

23. Može se upotrijebiti režim ponovljenih doza tretiranja, na primjer, zajedno s ispitivanjem na drugoj krajnjoj točki kod koje se upotrebljava razdoblje primjene od 28 dana (npr. ispitna metoda B.58.); međutim, bile bi potrebne dodatne skupine životinja kako bi se uzela u obzir različita vremena uzorkovanja. U skladu s tim, primjerenost tog režima treba znanstveno opravdati od slučaja do slučaja.

24. Prije eutanazije životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza kemikalije za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Zatim se nakon odgovarajućeg vremenskog intervala životinje podvrgavaju uzorkovanju. Za miševe i štakore taj interval iznosi približno 3–5 sati.

Visine doza

25. Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona doza jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju, u skladu s preporukama za provođenje istraživanja za određivanje raspona doza (12.). Tim bi se istraživanjem trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja se definira kao doza koja inducira blage toksične učinke povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sustavna citotoksičnost), ali ne inducira smrt ili znakove boli, patnje ili stresa zbog kojih bi životinju trebalo eutanazirati (13.).

26. Najviša se doza može definirati i kao doza pri kojoj se javljaju određeni znakovi toksičnosti u spermatogonijskim stanicama (npr. smanjenje omjera spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu). Navedeno smanjenje ne bi smjelo prelaziti 50 %.

27. Ispitivane kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.

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

▼M8

Primjena doza

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

Opažanja

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

Kromosomski pripravak

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

Analiza

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

33. Aberacije kromosomskog i kromatidnog tipa trebalo bi zabilježiti odvojeno i klasificirati prema podtipovima (lomovi, zamjene). Prekide bi trebalo zabilježiti, ali ne i uzimati u obzir, prilikom utvrđivanja inducira li kemikalija znatna povećanja učestalosti stanica s kromosomskim aberacijama. U postupcima koji se primjenjuju u laboratoriju trebalo bi osigurati da analizu kromosomskih aberacija provode dobro osposobljeni analitičari. Uzimajući u obzir

▼M8

da postupci pripreme predmetnih stakalaca često za posljedicu imaju lom jednog dijela metafaza uz posljedični gubitak kromosoma, stanice koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržavati broj centromera koji nije manji od $2n \pm 2$, pri čemu je n haploidan broj kromosoma za tu vrstu.

34. Iako je svrha ovog ispitivanja otkrivanje strukturnih kromosomskih aberacija, važno je zabilježiti učestalost poliploidnih stanica i stanica s endoreduplici-ranim kromosomima ako se opaze te pojave (vidjeti stavak 44.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

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

36. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 30.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.

— Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o negativnim kontrolama iz prijašnjih istraživanja, kod kojih se obično očekuje $> 0\ \%$ i $\leq 1{,}5\ \%$ stanica s kromosomskim aberacijama, i podacima o prijašnjim kontrolama laboratorija, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).

— Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim podacima o pozitivnoj kontroli, ako je dostupna, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).

— Analiziran je odgovarajući broj stanica i doza (vidjeti stavke 28. i 32.).

— Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 25. i 26.

38. Ako se promatraju i mitoza i mejoza, omjer spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu treba utvrditi kao mjerilo citotoksičnosti za sve tretirane životinje i životinje negativne kontrole, na ukupnom uzorku od 100 stanica u fazi diobe po životinji. Ako se promatra samo mitoza, potrebno je utvrditi mitotski indeks u barem 1 000 stanica za svaku životinju.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

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

▼**M8**

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

— ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,

— ako je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom, te

— ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

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

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

— ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, te

— ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

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

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

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

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

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

▼**M8**

Izvješće o ispitivanju

46. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Sažetak.

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Priprema ispitivane kemikalije:

— obrazloženje za odabir nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču,

— priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,

— analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije ako se provode.

Ispitne životinje:

— vrsta/soj te obrazloženje njihove uporabe,

— broj i dob životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— metoda jedinstvenog identificiranja životinja,

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

Ispitni uvjeti:

— podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),

▼**M8**

— podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je provedeno,

— obrazloženje odabira visine doze,

— obrazloženje odabira načina primjene,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— obrazloženje za vremena usmrćivanja životinja,

— metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni promatranje i vaganje životinje,

— metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,

— metoda eutanazije,

— metoda analgezije (ako se primjenjuje),

— postupci izdvajanja tkiva,

— naziv (identifikacijska oznaka) kemikalije za zaustavljanje metafaze, njezina koncentracija i trajanje primjene,

— metode pripreme predmetnih stakalaca,

— kriteriji za ocjenu aberacija,

— broj analiziranih stanica po životinji,

— kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Rezultati:

— stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,

— mase tijela i organa prije usmrćivanja (ako se primjenjuje više tretiranja, mase tijela izmjerene tijekom režima tretiranja),

— znakovi toksičnosti,

— mitotski indeks,

— omjer spermatogonijskih mitotskih stanica u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu, ili drugi dokaz izloženosti ciljnom tkivu,

— vrsta i broj aberacija, navedeni za svaku životinju zasebno,

— ukupan broj aberacija po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

▼**M8**

— broj stanica s aberacijama po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— odnos doze i odgovora, ako je to moguće,

— primijenjene statističke analize i metode,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama,

— podaci o prijašnjim negativnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama i intervalom pouzdanosti od 95 % (ako je dostupan) ili objavljeni podaci o prijašnjim negativnim kontrolama koji se upotrebljavaju za prihvatljivost rezultata ispitivanja,

— podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,

— promjene ploidije ako su zapažene, uključujući učestalost poliploidnih i/ili endoreduplicranih stanica.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariz.

2. Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. U: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 275.–306.

3. Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313.–318.

4. Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167.–189.

5. Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. U: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, str. 1.–15.

6. Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368.–379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. U: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, str. 477.–484.

7. Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472.–474.

8. Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371.–375.

9. Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135.–140.

▼**M8**

10. Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313.–324.

11. Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19.–30.

12. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313.–319.

13. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

14. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207.–209.

15. Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291.–294.

16. Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289.–294.

17. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, U: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115.–141.

18. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays U: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184.–232.

19. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87.–90.

20. Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29.–46.

21. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362.–1364.

22. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403.–413.

▼M8

Dodatak

DEFINICIJE

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

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

_____

▼B

B.25. **NASLJEDNA TRANSLOKACIJA U MIŠEVA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJA

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Test nasljedne translokacije kod miša otkriva strukturne i numeričke kromosomske promjene u zametnim stanicama sisavaca koje se javljaju kod potomstva prve generacije. Vrste otkrivenih kromosomskih promjena obuhvaćaju recipročne translokacije i, ako je uključeno potomstvo ženskog roda, gubitak kromosoma X. Kod nositelja translokacija i XO-ženki javlja se smanjena plodnost koja se koristi kako bi se odabralo potomstvo F_1 za citogenetsku analizu. Potpunu sterilnost izazivaju određeni tipovi translokacija (autosom X i tip c-t). Translokacije se citogenetski promatraju u mejotskim stanicama u dijakinezi-metafazi I pojedinih mužjaka, bilo mužjaka F_1 ili muških potomaka ženki F_1. Ženke tipa XO citogenetski se prepoznaju po prisutnosti samo 39 kromosoma u mitozi koštane srži.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

Priprema

Ispitivane kemikalije otope se u izotoničnoj fiziološkoj otopini. Ako su netopljive u navedenoj otopini, otope se ili suspendiraju u odgovarajućem nosaču. Koriste se svježe pripravljene otopine ispitivane tvari. Ako se radi lakšeg doziranja koristi nosač, on ne smije ometati djelovanje ispitivanog spoja, niti izazvati toksične učinke.

Put primjene

Uobičajeni putevi primjene su oralna intubacija ili intraperitonealna injekcija. Prikladni mogu biti i drugi putevi primjene.

Pokusne životinje

Radi lakšeg razmnožavanja i citološke verifikacije predmetni se pokusi obavljaju na miševima. Nije potreban nikakav specifični mišji soj. Ipak, u prosječno velikom leglu korištenog soja trebalo bi biti više od osam mladunaca i taj bi broj trebao biti relativno postojan.

Koriste se zdrave i spolno zrele životinje.

▼B

Broj životinja

Potreban broj životinja ovisi o učestalosti spontanih translokacija i najnižem stupnju indukcije koji je potreban za pozitivan rezultat.

Ispitivanje se obično obavlja analizom muškog potomstva F_1. Po svakoj skupini koja je primila određenu dozu treba ispitati barem 500 muških potomaka F_1. Ako je u ispitivanje uključeno i žensko potomstvo F_1, potrebno je 300 mužjaka i 300 ženki.

Primjena negativnih i pozitivnih kontrola

Trebalo bi imati na raspolaganju odgovarajuće kontrolne podatke dobivene paralelnim kontrolama i kontrolama iz prijašnjih ispitivanja. Kad postoje prihvatljivi rezultati pozitivne kontrole iz pokusa koji su nedavno provedeni u istom laboratoriju, ti se rezultati mogu upotrijebiti umjesto paralelne pozitivne kontrole.

Visine doza

Ispituje se jedna visina doze, obično najviša doza vezana uz izazivanje minimalnih toksičkih učinaka, ali bez utjecaja na reprodukciju ili preživljavanje. Kako bi se utvrdio odnos između doze i reakcije, potrebne su i dvije dodatne niže doze. Kad su u pitanju netoksične tvari životinje treba izložiti najvišim koncentracijama koje je moguće primijeniti.

Postupak

Tretiranje i parenje

Postoje dva režima tretiranja. Najčešća je jednokratna primjena ispitivane tvari. Ispitivana se tvar isto tako može primjenjivati sedam dana u tjednu tijekom razdoblja od 35 dana. Broj parenja koji slijedi nakon tretiranja određen je režimom tretiranja i trebao bi biti dovoljan da se tretirane zametne stanice mogu uzorkovati u svim fazama. Na kraju razdoblja parenja ženke se u kaveze stavljaju pojedinačno. Kada se ženke okote, bilježi se datum, broj i spol potomaka. Svi se muški potomci odbijaju od sise, dok se svi ženski potomci izlučuju ako nisu obuhvaćeni pokusom.

Testiranje na translokacijsku heterozigotnost

Koristi se jedna od dvije moguće metode:

— ispitivanje plodnosti potomstva F_1 i naknadna verifikacija mogućih nositelja translokacije citogenetskom analizom,

— citogenetska analiza svih potomaka F_1 bez prethodne selekcije na temelju ispitivanja plodnosti.

(a) Ispitivanje plodnosti

Smanjena plodnost jedinke F_1 može se utvrditi praćenjem veličine legla i/ili analizom materičnog sadržaja kod parenih ženki.

Treba utvrditi kriterije za određivanje normalne i smanjene plodnosti za korišteni soj miševa.

▼B

Opažanje veličine legla: mužjaci F_1 koji će se testirati pojedinačno se stavljaju u kaveze sa ženkama iz istog pokusa ili iz kolonije. Kavezi se svakodnevno provjeravaju, počevši od 18. dana po parenju. Nakon okota bilježi se veličina legla i spol potomaka F_2, nakon čega se legla izlučuju. Ako se test provodi na ženskom potomstvu F_1, potomstvo F_2 iz malih legla zadržava se za daljnja ispitivanja. Ženski nositelji translokacija provjeravaju se citogenetskom analizom translokacije kod bilo kojega od njihovih muških potomaka. Ženke tipa XO prepoznaju se po promjeni omjera jedinki muškog spola naprama jedinkama ženskog spola u njihovom potomstvu iz 1:1 u 1:2. Kod primjene sekvencijskog postupka normalne životinje F_1 eliminiraju se iz daljnjeg ispitivanja ako prvo leglo F_2 dosegne ili premaši unaprijed određenu normalnu vrijednost, a ako do tog ne dođe opaža se drugo ili treće leglo F_2.

Životinje F_1 koje se po opažanju najviše tri legla F_2 ne mogu klasificirati kao normalne, ili se dalje ispituju analizom materičnog sadržaja u ženki ili se izravno podvrgavaju citogenetskoj analizi.

Analiza materičnog sadržaja: do smanjenja veličine legla nositelja translokacije dolazi uslijed smrti embrija, pa visoki broj mrtvih implanata ukazuje na prisutnost translokacije kod životinje koja se ispituje. Svaki mužjak F_1 na kojemu će se obaviti ispitivanje pari se s dvije do tri ženke. Začeće se utvrđuje pregledom na postojanje vaginalnih čepova koji se obavlja svakog jutra. Ženke se usmrćuju 14 do 16 dana kasnije te se bilježe živi i mrtvi implanti u njihovim maternicama.

(b) Citogenetska analiza

Preparati testisa pripremaju se tehnikom sušenja na zraku. Nositelji translokacija prepoznaju se po postojanju multivalentnih struktura u primarnim spermatocitima u dijakinezi-metafazi I. Opažanje barem dviju stanica s multivalentnom asocijacijom čini potreban dokaz da je ispitana životinja nositelj translokacije.

Ako nije obavljena uzgojna selekcija svi se mužjaci F_1 podvrgavaju citogenetskom pregledu. Nužno je mikroskopski utvrditi postojanje barem 25 stanica u dijakinezi-metafazi I po mužjaku. Potreban je pregled mitotskih metafaza u spermatogonijima ili koštanoj srži kod mužjaka F_1 s malenim testisima i mejotskom diobom prije dijakineze ili kod ženki F1 za koje se sumnja da su tipa XO. Postojanje neobično dugog i/ili kratkog kromosoma u svakoj od 10 stanica dokaz je posebne translokacije koja izaziva sterilnost u mužjaka (c-t tip). Neke translokacije autosoma X koje uzrokuju sterilnost mužjaka moguće je utvrditi samo analizom uz primjenu metode pruganja mitotskih kromosoma. Postojanje 39 kromosoma u svih 10 mitoza dokaz je postojanja stanja XO kod ženke.

2. **PODACI**

Podaci se prikazuju u obliku tablice.

Za svaki interval parenja, nakon parenja roditelja, bilježi se srednja veličina legla i omjer spolova potomaka, odmah po okotu i nakon odbijanja od sise.

▼B

Za ocjenu plodnosti životinja F_1 navodi se srednja veličina legla nakon parenja svih normalnih jedinki i veličine pojedinačnih legla nositelja translokacija F1. Za analizu materičnog sadržaja navodi se prosječni broj živih i mrtvih implanata nastalih parenjem normalnih jedinki, te broj živih i mrtvih implanata nastalih svakim pojedinačnim parenjem nositelja translokacije F_1.

Za citogenetsku analizu dijakineze-metafaze I za svakog se nositelja translokacije bilježi broj tipova multivalentnih struktura i ukupan broj stanica.

Za sterilne jedinke F_1 bilježi se ukupan broj parenja i trajanje razdoblja parenja. Navodi se i težina testisa i pojedinosti dobivene citogenetskom analizom.

Za ženke tipa XO bilježi se srednja veličina legla, omjer spolova kod potomaka F_1 i rezultati citogenetske analize.

Kad je moguće, nositelji translokacije F_1 prethodno se selektiraju na temelju testova plodnosti pa u tablice treba unijeti podatke o tome koliki broj njih su potvrđeni translokacijski heterozigoti.

Treba navesti i podatke dobivene pokusima s pozitivnom i negativnom kontrolom.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati sljedeće informacije:

— soj miševa, dob životinja, tjelesna masa tretiranih životinja,

— broj roditeljskih životinja svakog spola u pokusnim i kontrolnim skupinama,

— uvjeti ispitivanja, detaljan opis tretiranja, visine doza, otapala, režim parenja,

— broj i spol potomaka svake ženke, broj i spol potomaka uzgojenih za analizu translokacije,

— vrijeme i kriteriji analize translokacije,

— broj i detaljan opis nositelja translokacije, uključujući podatke o parenju i podatke o materičnom sadržaju, ovisno o slučaju,

— citogenetski postupci i pojedinosti o mikroskopskoj analizi, po mogućnosti uz slike,

— statistička ocjena,

— diskusija o rezultatima,

— tumačenje rezultata.

▼B

3.2. OCJENA I TUMAČENJE

Vidjeti Opći uvod, dio B.

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B.

▼B

B.26. **TEST SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVCIMA 90-DNEVNA STUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA**

1. **METODA**

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 408 (1998.)

1.1. UVOD

Pri ocjenjivanju toksičkih svojstava neke kemikalije, subkronična oralna toksičnost može se utvrditi metodom ponavljanih doza nakon što se testom akutne toksičnosti ili 28-dnevnim testom toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza dobiju početne informacije o njezinoj toksičnosti. 90-dnevnom studijom dobiju se informacije o mogućim opasnostima za zdravlje za koje je vjerojatno da će se javiti pri ponavljanoj dugotrajnoj izloženosti u razdoblju sazrijevanja i razvoja nakon odbijanja od sise, te dobrim dijelom i u odrasloj dobi. Ta studija omogućuje dobivanje informacija o značajnijim toksičnim učincima, o ciljnim organima i mogućnosti akumulacije, kao i procjenu razine izloženosti kod koje nema vidljivih štetnih učinaka (NOAEL) koja se može upotrijebiti pri odabiru visina doza za studije kronične toksičnosti i za utvrđivanje sigurnosnih kriterija za izloženost čovjeka.

Ova metoda stavlja dodatni naglasak na neurološke krajnje učinke i ukazuje na moguće imunološke i reproduktivne učinke. Isto tako naglašena je i potreba za pažljivim kliničkim opažanjem životinja kako bi se prikupilo što više informacija. Ova bi studija trebala omogućiti prepoznavanje kemikalija koje imaju potencijal za izazivanje neurotoksičkih i imunoloških učinaka, kao i učinaka na reproduktivnim organima, što može opravdati daljnja detaljna istraživanja.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Doza: količina ispitivane tvari koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane tvari po jedinici tjelesne mase pokusne životinje (npr. mg/kg) ili kao stalna koncentracija u hrani (ppm).

Doziranje: opći pojam koji obuhvaća dozu, njenu učestalost i trajanje doziranja.

NOAEL: skraćenica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka (No Observed Adverse Effect Level) i najviša je doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci vezani uz tretiranje.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana se tvar 90 dana svakodnevno oralno primjenjuje u stupnjevanim dozama na nekoliko skupina pokusnih životinja, po jedna visina doze na svaku skupinu. Tijekom razdoblja primjene životinje se pažljivo promatraju radi uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu usmrćene tijekom ispitivanja obavlja se obdukcija, s tim da se po završetku ispitivanja preživjele životinje usmrćuju i također obduciraju.

▼B

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Priprema životinja**

Treba koristiti zdrave životinje koje su se barem 5 dana privikavale na laboratorijske uvjete i koje nisu bile podvrgnute prethodnim ispitnim postupcima. Životinje treba okarakterizirati s obzirom na njihovu vrstu, soj, podrijetlo, spol, tjelesnu masu i/ili dob. Životinje se nasumično raspoređuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Svakoj se životinji dodjeljuje jedinstveni identifikacijski broj.

1.4.2. **Priprema doza**

Ispitivana se tvar primjenjuje oralnom intubacijom pomoću želučane sonde, odnosno preko hrane ili vode za piće. Metoda oralne primjene ovisi o svrsi studije i fizikalnim/kemijskim svojstvima ispitivanog materijala.

Prema potrebi, ispitivana se tvar otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Kad god je moguće, preporuča se najprije razmotriti mogućnost primjene vodene otopine/suspenzije, zatim mogućnost primjene otopine/emulzije u ulju (npr. kukuruzno ulje), i tek na kraju mogućnost otapanja u ostalim nosačima. Za sve nosače, osim vode, moraju biti poznata toksička svojstva. Treba utvrditi stabilnost ispitivane tvari u uvjetima primjene.

1.4.3. **Uvjeti ispitivanja**

1.4.3.1. *Pokusne životinje*

Najčešće korištena životinjska vrsta je štakor, iako se mogu koristiti i neke druge vrste glodavaca, npr. miš. Treba upotrijebiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji su uobičajeni u laboratorijskoj praksi. Odabiru se ženke koje prethodno nisu imale leglo i koje nisu gravidne. S doziranjem treba započeti što je prije moguće nakon odbijanja mladunaca od sise, a u svakom slučaju, prije nego životinje navrše devet tjedana. Na početku ispitivanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja smiju biti minimalne i ne premašivati ± 20 % prosječne tjelesne mase svakog spola. U slučajevima kad se prije dugotrajne studije kronične toksičnosti provodi preliminarna studija, u obje studije treba koristiti životinje istog soja i istog podrijetla.

1.4.3.2. *Broj i spol*

Najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka) treba upotrijebiti za ispitivanje svake visine doze. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, prije završetka studije, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđen za takvo usmrćivanje. Na temelju prijašnjih saznanja o kemikaliji ili nekom bliskom analogu, treba razmotriti mogućnost uključivanja dodatne satelitske skupine od deset životinja (pet od svakog spola) u kontrolnu skupinu i u skupinu koja će primiti najvišu dozu, radi opažanja reverzibilnosti ili postojanosti bilo kojega od toksičkih učinaka nakon razdoblja tretiranja. Odgovarajuće trajanje ovog razdoblja određuje se s obzirom na učinke koji će se opažati.

▼B

1.4.3.3. *Visine doza*

Treba upotrijebiti najmanje tri visine doza i paralelne kontrole, osim u slučajevima kad se izvodi granični test (vidjeti 1.4.3.4.). Visine doza mogu se utvrđivati na temelju rezultata studija s ponavljanim dozama ili studija za utvrđivanje raspona doza, pri čemu treba uzeti u obzir sve postojeće toksikološke podatke i podatke o toksikokinetici koji se odnose na ispitivanu tvar ili srodne materijale. Ako nije ograničena fizikalno-kemijskim svojstvima ili biološkim djelovanjem ispitivane tvari, najvišu dozu treba odabrati s ciljem da se izazove toksičnost, ali ne i smrt ili velika patnja životinja. Treba odabrati niz sve nižih doza koje će se primjenjivati za utvrđivanje svih reakcija vezanih uz doziranje, kao i dozu kod koje nema vidljivih štetnih učinaka (NOAEL) kao najnižu dozu. Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu pokusnu skupinu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 6-10).

Kontrolna skupina je netretirana skupina ili skupina tretirana samo nosačem, ako se kod primjene ispitivane tvari koristi nosač. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na jednak način kao i sa životinjama u tretiranoj skupini. Ako se koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu. Ako se ispitivana tvar daje u hrani i time se prouzroči smanjeni unos hrane, korištenje paralelno hranjene kontrolne skupine životinja može se pokazati korisnim pri razlikovanju smanjenja uzrokovanog okusom od smanjenja uzrokovanog toksikološkim promjenama u ispitnom modelu.

Treba uzeti u obzir sljedeća svojstva nosača i drugih aditiva, ovisno o slučaju: djelovanje na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili retenciju (zadržavanje) ispitivane tvari; djelovanje na kemijska svojstva ispitivane tvari, koje može promijeniti njezina toksička svojstva; i djelovanje na unos hrane i vode ili na stanje uhranjenosti životinja.

1.4.3.4. *Granični test*

Ako test s jednom visinom doze, koja iznosi najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne izazove vidljive štetne učinke i ako se toksičnost ne očekuje na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima, potpuna studija uz primjenu tri visine doza neće se smatrati neophodnom. Granični test ne vrijedi samo u slučajevima kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom više doze.

1.5. POSTUPAK

1.5.1. **Primjena doza**

Životinjama se ispitivana tvar dozira svakodnevno, sedam dana u tjednu, u razdoblju od 90 dana. U slučaju bilo kojeg drugog režima doziranja, npr. pet dana u tjednu, treba dokazati njegovu opravdanost. U slučaju primjene oralnom intubacijom, ispitivanu tvar treba dati u jednoj dozi pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina gdje je dopušteno upotrijebiti 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih tvari kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru, kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

▼B

Kod tvari koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane tvari o kojoj je riječ ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana tvar daje u hrani, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje; alternativa koja se koristi u pokusu mora se specificirati. U slučajevima kad se ispitivana tvar daje oralnom intubacijom, dozu treba davati svaki dan otprilike u isto vrijeme te je po potrebi prilagođavati kako bi se održala stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kada se prije dugotrajnog ispitivanja kronične toksičnosti radi 90-dnevna preliminarna studija, u obje studije prehrana životinja treba biti slična.

1.5.2. **Opažanja**

Opažanje bi trebalo trajati najmanje 90 dana. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje treba tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja držati bez tretiranja kako bi se utvrdilo jesu li toksički učinci postojani ili su se životinje od njih oporavile.

Opća bi klinička opažanja trebalo obavljati barem jednom dnevno, nabolje u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja. Kliničko stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i mortaliteta.

Barem jednom prije prvog izlaganja, te jednom tjedno nakon toga, treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih životinja (što će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom ograđenom prostoru i svaki put otprilike u isto vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo zabilježiti, pri čemu je najbolje koristiti sustav vrednovanja jasno definiran od strane laboratorija koji obavlja ispitivanje. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima opažanja budu minimalna. Opažani simptomi trebaju obuhvaćati, ali ne biti ograničeni na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu sekreta i ekskreta te aktivnost autonomnog živčanog sustava (npr. lakrimacija (suzenje), piloerekcija (naježenost dlake), veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug) ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (1).

Oftalmološki pregled, pomoću oftalmoskopa ili druge odgovarajuće opreme, treba obaviti prije primjene ispitivane tvari i po završetku studije, najbolje na svim životinjama, ili barem u skupinama koje primaju visoke doze i kontrolnim skupinama. Ako se otkriju promjene na očima, treba pregledati sve životinje.

Prema kraju razdoblja izlaganja, a u svakom slučaju ne ranije od 11. tjedna, treba obaviti ocjenu senzorne reaktivnosti na različite podražaje (1) (npr. zvučne, vizualne i proprioceptivne) (2)(3)(4), ocjenu jakosti stiska (5) te ocjenu motoričke aktivnosti (6). Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, osim referentnih, mogu se primjenjivati i alternativni postupci.

Funkcionalna opažanja koja se obavljaju prema kraju ispitivanja mogu se izostaviti kad postoje podaci o funkcionalnim opažanjima iz drugih studija, a dnevnim kliničkim opažanjima nisu otkriveni nikakvi funkcionalni nedostaci.

▼B

U izuzetnim slučajevima funkcionalna opažanja mogu izostati i kod skupina koje na drugi način pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

1.5.2.1. *Tjelesna masa i unos hrane/vode*

Sve životinje treba vagati barem jednom tjedno. Unos hrane treba mjeriti najmanje na tjednoj osnovi. Ako se ispitivana tvar daje s vodom za piće, unos vode isto tako treba mjeriti najmanje na tjednoj osnovi. Unos vode može se pratiti i u studijama koje se odnose na normalno hranjenje ili prisilno hranjenje na sondu, pri čemu može doći do promjena u unosu tekućine.

1.5.2.2. *Hematologija i klinička biokemija*

Uzorke krvi je potrebno uzeti na specificiranom mjestu i pohraniti u odgovarajućim uvjetima, ovisno o konkretnom slučaju. Na kraju razdoblja ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno prije ili u okviru postupka usmrćivanja životinja.

Na kraju razdoblja ispitivanja kad god se u međuvremenu prikupe bilo kakvi uzorci krvi, treba obaviti sljedeće hematološke pretrage: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi.

Kliničke biokemijske pretrage za utvrđivanje jakog toksičkog djelovanja na tkiva i posebno na bubrege i jetru, treba obaviti na uzorcima krvi uzetim od svake životinje neposredno prije usmrćivanja ili u okviru postupka usmrćivanja, (osim od životinja za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su neplanirano usmrćene tijekom pokusa). Za klinička biološka ispitivanja uzorci se mogu uzimati i u međuvremenu, slično kao kod hematoloških pretraga. Preporuča se da životinje tijekom noći pred uzimanje uzoraka krvi poste ([1]). Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebaju obuhvatiti mjerenje natrija, kalija, glukoze, ukupne količine kolesterola, ureje, dušika iz ureje u krvi (BUN), kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te više od dva enzima indikativna za hepatocelularna oštećenja (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama glutamil transpeptidaza i sorbitol dehidrogenaza). Mogu se uključiti i mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog podrijetla) i žučnih kiselina, kojima se pod određenim okolnostima mogu dobiti korisne informacije.

U zadnjem tjednu studije neobvezno se mogu obaviti analize urina dobivenog sabiranjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne stanice.

Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera koji označivaju oštećenja tkiva. Ako poznata svojstva ispitivane tvari mogu, ili se očekuje da će, utjecati na određene metaboličke profile treba obaviti i druge pretrage koje uključuju kalcij, fosfor, trigliceride natašte, specifične hormone, methemoglobin i kolinesterazu. Te vrijednosti treba izmjeriti kod izloženosti kemikalijama određenih klasa opasnosti ili od slučaja do slučaja.

([1]) Kod niza mjerenja u serumu i plazmi, osobito kad se mjeri glukoza, preporuča se post životinja preko noći. Glavni razlog tome je činjenica da povećana varijabilnost, do koje bi neminovno došlo u slučaju da se životinjama hrana ne uskrati, vjerojatno bi prikrila suptilnije učinke i otežala tumačenje rezultata. S druge strane, međutim, post tijekom noći može omesti opći metabolizam životinje i, osobito u studijama čiji je predmet prehrana, može utjecati na dnevnu izloženost ispitivanoj tvari. Ako se odluči za post tijekom noći, klinička biokemijska ispitivanja treba obaviti nakon provođenja funkcionalnih opažanja u okviru studije.

▼B

Uglavnom, ovdje je potreban fleksibilan pristup, ovisno o životinjskoj vrsti i opaženim i/ili očekivanim učincima predmetne tvari.

Ako podaci o normalnim vrijednostima korišteni u prijašnjim pokusima nisu adekvatni, treba razmotriti je li potrebno utvrditi hematološke i kliničke biokemijske varijable prije nego se započne s doziranjem; općenito se ne preporuča te podatke utvrđivati prije tretiranja (7).

1.5.2.3. *Obdukcija (makroskopska analiza)*

Sve životinje korištene u studiji moraju se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj analizi koja uključuje pažljivi pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. S jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, testisa, epididimisa (pasjemenika), maternice, jajnika, timusa, slezene, mozga i srca svih životinja (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili se neplanirano usmrte tijekom pokusa) treba obrezati svo okolno tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon sekcije, kako bi se izbjeglo sušenje organa.

Slijedeća tkiva treba čuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve velike lezije, mozak (reprezentativne regije, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu (uzetu na tri razine: cervikalnoj (vratnoj), srednjoj torakalnoj (prsnoj) i lumbalnoj (slabinskoj)), hipofizu, štitnjaču, paratiroidnu žlijezdu, timus (prsnu žlijezdu), jednjak, žlijezde slinovnice, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, gušteraču, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), aortu, spolne žlijezde, maternicu, pomoćne spolne organe, mliječnu žlijezdu ženke, prostatu, mokraćni mjehur, žučni mjehur (miš), limfne čvorove (po mogućnosti, jedan koji pokriva put unosa ispitivane tvari u organizam i drugi koji je udaljen od puta unosa, kako bi se vidjeli sistemski učinci), periferni živac (bedreni (*n. ischiadicus*) ili tibijalni (*n. tibialis*)) po mogućnosti smješten uz mišić, odsječak koštane srži (ili, alternativno, svježi aspirat koštane srži), kožu i oči (ako se prilikom oftalmoloških pregleda opaze promjene). Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve one organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane tvari smatra da bi mogli biti ciljni.

1.5.2.4. *Histopatologija*

Ako se kod životinja na koje su primijenjene visoke doze ispitivane tvari primijete promjene, histopatološki pregled treba obaviti i na životinjama iz svih ostalih skupina.

Treba pregledati sve veće lezije.

Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled onih tkiva i organa na kojima su kod tretiranih životinja primijećene promjene.

▼B

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Podatke treba prikazati pojedinačno za svaku životinju. Osim toga, najbolje ih je rezimirati u obliku tablice iz koje se za svaku testiranu skupinu vidi broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule ili su iz humanih razloga bile usmrćene tijekom ispitivanja, vrijeme smrti ili humanog usmrćivanja, broj životinja kod kojih su opaženi znakovi toksičnosti, opis opažanih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i stupanj svih toksičkih učinaka, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i postotak životinja koje pokazuju određene vrste lezija.

Tamo gdje je to moguće, sve rezultate treba analizirati uz primjenu odgovarajuće opće prihvatljive statističke metode. Statističke metode i podatke koji će se analizirati treba odabrati još u fazi planiranja studije.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

2.2.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalni oblik (agregatno stanje), čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci,

— nosač (ovisno o slučaju): dokaz opravdanosti odabira nosača, ako se ne radi o vodi.

2.2.2. **Vrsta pokusnih životinja:**

— korištena vrsta i soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— pojedinačne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja.

2.2.3. **Uvjeti ispitivanja:**

— obrazloženje za odabir visina doza,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravaka,

— podaci o primjeni ispitivane tvari,

— stvarne doze (mg/kg tjelesne težine/dan) i faktor za preračunavanje koncentracije ispitivane tvari u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, prema potrebi,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

2.2.4. **Rezultati:**

— tjelesna masa i promjene u tjelesnoj masi,

— unos hrane i unos vode, prema potrebi,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i visini doza, uključujući znakove toksičnosti,

▼B

— vrsta, stupanj i trajanje opaženih kliničkih promjena (jesu li reverzibilne ili nisu),

— rezultati oftalmološkog pregleda,

— senzorska aktivnost, ocjena jačine stiska i motorne aktivnosti (ako su raspoloživi),

— hematološka ispitivanjima s relevantnim normalnim vrijednostima,

— klinička biokemijska ispitivanja s relevantnim normalnim vrijednostima,

— tjelesna masa nakon smrti, masa organa, te omjer mase organa i tjelesne mase,

— nalazi obdukcije,

— detaljni opis svih histopatoloških nalaza,

— podaci o apsorpciji, ako postoje,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

3. **REFERENCE**

(1) IPCS (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, str. 999-1003.

(3) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, str. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, str. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T., (1979) A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, str. 233-236.

(6) 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, str. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*., (1996) „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, str. 198-201.

▼B

B.27. **TEST SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNO ISPITIVANJE ORALNE TOKSIČNOSTI NA NEGLODAVCIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA**

1. **METODA**

Ova ispitna metoda subkronične oralne toksičnosti istovjetna je metodi OECD TG 409 (1998.).

1.1. UVOD

Kod ocjenjivanja toksičnih svojstava neke kemikalije, utvrđivanje subkronične oralne toksičnosti pomoću ponavljanih doza može uslijediti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti 28-dnevnim ispitivanjem uz primjenu akutne (jednokratne) doze ili ponavljanih doza. 90-dnevnim ispitivanjem dobivaju se informacije o mogućim opasnostima po zdravlje koje bi mogle proizaći iz ponavljane izloženosti tijekom razdoblja ubrzanog razvoja i ulaska u mlađu odraslu dob. Tim se ispitivanjima dobivaju podaci o značajnim toksičkim učincima, utvrđuju ciljni organi i mogućnost akumulacije, te se procjenjuje razina izloženosti kod koje nema vidljivih štetnih učinaka izlaganja, što se može upotrijebiti kod odabira visina doza za studije kronične toksičnosti i za utvrđivanje sigurnosnih kriterija za izloženost ljudi.

Ispitna metoda omogućuje utvrđivanje štetnih učinaka izlaganja kemikalijama kod neglodavaca te bi je isključivo trebalo koristiti:

— kad učinci opaženi u drugim studijama ukazuju na potrebu za pojašnjenjem/karakterizacijom uz upotrebu neke druge vrste neglodavaca, ili

— kad toksikokinetičke studije pokazuju da određena vrsta neglodavaca predstavlja najrelevantniji izbor laboratorijske životinje, ili

— u slučajevima kad drugi specifični razlozi opravdavaju upotrebu određene vrste neglodavaca.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Doza: količina ispitivane tvari koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane tvari po jedinici tjelesne mase pokusne životinje (npr. mg/kg) ili kao stalna koncentracija u hrani (ppm).

Doziranje: opći pojam koji obuhvaća dozu, njenu učestalost i trajanje doziranja.

NOAEL: skraćenica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka (No Observed Adverse Effect Level) i najviša je doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci vezani uz tretiranje.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana se tvar 90 dana svakodnevno oralno primjenjuje u stupnjevanim dozama na nekoliko skupina pokusnih životinja, po jedna visina doze na svaku skupinu. Tijekom razdoblja primjene životinje se pažljivo promatraju radi uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu usmrćene tijekom ispitivanja obavlja se obdukcija, s tim da se po završetku ispitivanja, preživjele životinje usmrćuju i također obduciraju.

▼B

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Odabir životinjske vrste**

Najčešće korištena životinjska vrsta osim glodavaca je pas, koji bi trebao biti određene pasmine; često se koristi bigl. Mogu se koristiti i druge životinjske vrste, npr. svinja i patuljasta svinja. Korištenje primata se ne preporučuje, a njihova eventualna upotreba treba biti znanstveno opravdana. Treba koristiti mlade zdrave životinje i ako se radi o psima doziranje je najbolje započeti kad su životinje stare 4-6 mjeseci, a najviše 9 mjeseci. Kad se studija obavlja kao preliminarna, prije dugotrajne studije kronične toksičnosti, u obje studije treba upotrijebiti istu životinjsku vrstu/pasminu.

1.4.2. **Priprema životinja**

Treba koristiti mlade zdrave životinje koje su se prilagodile laboratorijskim uvjetima i prethodno nisu bile podvrgavane pokusnim postupcima. Trajanje prilagođavanja ovisit će o odabranoj vrsti pokusnih životinja i njihovom podrijetlu. Preporuča se prilagođavanje u trajanju od najmanje 5 dana za pse ili svinje uzgojene za tu svrhu u okviru kolonije životinja koja trajno obitava na lokaciji ispitivanja, te barem 2 tjedna za istu vrstu životinja ako potječu iz vanjskih izvora. Pokusne životinje treba okarakterizirati s obzirom na njihovu vrstu, soj, podrijetlo, spol, tjelesnu masu i/ili dob. Životinje treba nasumce rasporediti u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Kaveze treba tako rasporediti da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj.

1.4.3. **Priprema doza**

Ispitivana se tvar može davati u hrani ili vodi za piće, oralnom intubacijom ili u kapsulama. Metoda oralne primjene ovisi o svrsi studije i fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanog materijala.

Prema potrebi, ispitivana se tvar otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Kad god je moguće, preporuča se najprije razmotriti mogućnost primjene vodene otopine/suspenzije, zatim mogućnost primjene otopine/emulzije u ulju (npr. kukuruzno ulje), i tek na kraju mogućnost otapanja u ostalim nosačima. Za sve nosače, osim vode, moraju biti poznata toksička svojstva. Treba utvrditi stabilnost ispitivane tvari u uvjetima primjene.

1.5. POSTUPAK

1.5.1. **Broj i spol**

Za ispitivanje svake visine doze treba upotrijebiti najmanje osam životinja (četiri ženke i četiri mužjaka). Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, prije završetka studije, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđen za takvo usmrćivanje. Broj životinja na kraju ispitivanja mora biti dovoljan da ocjenjivanje toksičkih učinaka bude od značaja. Na temelju prijašnjih saznanja o kemikaliji ili nekom bliskom analogu, treba razmotriti mogućnost uključivanja dodatne satelitske skupine od osam životinja (po četiri od svakog spola) u kontrolnu skupinu i u skupinu koja će primiti najvišu dozu, radi opažanja reverzibilnosti ili postojanosti bilo kojega od toksičkih učinaka nakon razdoblja tretiranja. Treba utvrditi odgovarajuće trajanje ovog razdoblja s obzirom na učinke koji će se promatrati.

▼B

1.5.2. **Doziranje**

Treba upotrijebiti najmanje tri visine doza i paralelne kontrole, osim u slučajevima kad se izvodi granični test (vidjeti 1.5.3.). Visine doza mogu se utvrđivati na temelju rezultata studija s ponavljanim dozama ili studija za utvrđivanje raspona doza, pri čemu treba uzeti u obzir sve postojeće toksikološke podatke i podatke o toksikokinetici koji se odnose na ispitivanu tvar ili srodne materijale. Ako nije ograničena fizikalno-kemijskim svojstvima ili biološkim djelovanjem ispitivane tvari, najvišu dozu treba odabrati s ciljem da se izazove toksičnost, ali ne i smrt ili velika patnja životinje. Treba odabrati niz sve nižih doza koje će se primjenjivati za utvrđivanje svih reakcija vezanih uz doziranje, kao i dozu kod koje nema vidljivih štetnih učinaka (NOAEL) kao najnižu dozu. Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali i često je bolje dodati četvrtu pokusnu skupinu nego između doziranja upotrijebiti jako velike intervale (npr. iznad faktora 6-10).

Kontrolna skupina je netretirana skupina ili skupina tretirana samo nosačem, ako se kod primjene ispitivane tvari koristi nosač. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na jednak način kao i sa životinjama u tretiranoj skupini. Ako se koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu. Ako se ispitivana tvar daje u hrani i time se prouzroči smanjeni unos hrane, korištenje paralelno hranjene kontrolne skupine životinja može se pokazati korisnim pri razlikovanju smanjenja uzrokovanog okusom od smanjenja uzrokovanog toksikološkim promjenama u ispitnom modelu.

Treba uzeti u obzir sljedeća svojstva nosača i drugih aditiva, ovisno o slučaju: djelovanje na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili retenciju (zadržavanje) ispitivane tvari; djelovanje na kemijska svojstva ispitivane tvari, koje može promijeniti njezina toksička svojstva; i djelovanje na unos hrane ili vode ili na stanje uhranjenosti životinja.

1.5.3. **Granični test**

Ako test s jednom visinom doze koja iznosi najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan, uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne izazove vidljive štetne učinke i ako se toksičnost ne očekuje na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima, potpuna studija uz primjenu tri visine doza ne smatra se potrebnom. Granični test ne vrijedi samo u slučajevima kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom više doze.

1.5.4. **Primjena doza**

Životinjama se ispitivana tvar dozira svakodnevno, sedam dana u tjednu, u razdoblju od 90 dana. U slučaju bilo kojeg drugog režima doziranja, npr. pet dana u tjednu, treba dokazati njegovu opravdanost. U slučaju primjene oralnom intubacijom, ispitivanu tvar treba primijeniti kao jednu dozu pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen treba biti što je moguće manji. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih tvari kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru, kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

▼B

Kod tvari koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane tvari o kojoj je riječ ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana tvar daje u hrani, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje; alternativa koja se koristi u pokusu mora se specificirati. U slučajevima kad se ispitivana tvar daje oralnom intubacijom ili u kapsulama, dozu treba davati svaki dan otprilike u isto vrijeme te je po potrebi prilagođavati kako bi se održala stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kada se prije dugotrajnog ispitivanja kronične toksičnosti radi 90-dnevna preliminarna studija, u obje studije prehrana životinja treba biti slična.

1.5.5. **Opažanja**

Opažanje bi trebalo trajati najmanje 90 dana. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje treba tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja držati bez tretiranja kako bi se utvrdilo jesu li toksički učinci postojani ili su se životinje od njih oporavile.

Opća bi klinička opažanja trebalo obavljati barem jednom dnevno, nabolje u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja. Kliničko stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i mortaliteta.

Barem jednom prije prvog izlaganja, te jednom tjedno nakon toga, treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih životinja (što će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom ograđenom prostoru i svaki put otprilike u isto vrijeme. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima opažanja budu minimalna. Opažani simptomi trebaju obuhvaćati, ali ne biti ograničeni na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu sekreta i ekskreta te aktivnost autonomnog živčanog sustava (npr. lakrimacija (suzenje), piloerekcija (naježenost dlake), veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug) ili bilo kakvog neobičnog ponašanja.

Oftalmološki pregled pomoću oftalmoskopa ili druge odgovarajuće opreme, treba obaviti prije primjene ispitivane tvari i po završetku studije, najbolje na svim životinjama ili barem u skupinama koje primaju visoke doze te u kontrolnim skupinama. Ako se otkriju promjene na očima, treba pregledati sve životinje.

1.5.5.1. *Tjelesna masa i unos hrane/vode*

Sve životinje treba vagati barem jednom tjedno. Unos hrane treba mjeriti najmanje na tjednoj osnovi. Ako se ispitivana tvar daje s vodom za piće, treba mjeriti i unos vode, i to barem na tjednoj razini. Unos vode može se pratiti i u studijama koje se odnose na normalno hranjenje ili prisilno hranjenje na sondu, pri čemu može doći do promjena u unosu tekućine.

▼B

1.5.5.2. *Hematologija i klinička biokemija*

Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu i, ovisno o slučaju, pohraniti u odgovarajućim uvjetima. Na kraju razdoblja ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno prije ili u okviru postupka usmrćivanja životinja.

Na početku studije, a potom ili u mjesečnim intervalima ili sredinom ispitnog razdoblja i, konačno, na kraju ispitnog razdoblja treba napraviti hematološke pretrage koje uključuju hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita te mjerenje potencijala zgrušavanja, odnosno vremena zgrušavanja, protrombinskog vremena ili tromboplastinskog vremena.

Kliničke biokemijske pretrage za utvrđivanje jakog toksičkog djelovanja na tkiva i posebno na bubrege i jetru, treba obaviti na uzorcima krvi uzetima od svih životinja na početku, a potom ili u mjesečnim intervalima, ili sredinom ispitnog razdoblja i, konačno, na kraju ispitnog razdoblja. Područja koja treba ispitati uključuju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljikohidrata te funkciju jetre i bubrega. Na odabir specifičnih oblika ispitivanja utjecat će zapažanja o načinu djelovanja ispitivane tvari. Prije uzimanja uzoraka krvi preporuča se da životinje poste određeno vrijeme koje će ovisiti o životinjskoj vrsti. Preporučene pretrage obuhvaćaju mjerenje razine kalcija, fosfora, klorida, natrija, kalija, glukoze natašte, alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, ornitin dekarboksilaze, gama glutamil transpeptidaze, dušika iz ureje, albumina, kreatinina u krvi, te mjerenje ukupne vrijednosti bilirubina i proteina u serumu.

Analizu urina treba napraviti najmanje na početku, zatim oko sredine i, konačno, na kraju studije uz primjenu metode prikupljanja urina u određenim vremenskim razmacima. Analiza urina uključuje: izgled, količinu, osmolalnost ili specifičnu težinu, pH, protein, glukozu i krv/krvne stanice. Ako istraživanje opaženih učinaka treba proširiti, prema potrebi se mogu uvesti dodatni parametri.

Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera općih tkivnih oštećenja. Ostale pretrage koje mogu biti potrebne radi donošenja odgovarajuće toksikološke ocjene obuhvaćaju analizu lipida, hormona, acido-bazne ravnoteže, methemoglobina i inhibicije kolinesteraze. Ako istraživanje opaženih učinaka treba proširiti, prema potrebi se mogu uvesti dodatne biokemijske pretrage. Njih treba utvrditi za kemikalije svrstane u određene klase opasnosti, ili od slučaja do slučaja.

Uglavnom, ovdje je potreban fleksibilan pristup, ovisno o životinjskoj vrsti i opaženim i/ili očekivanim učincima predmetne tvari.

1.5.5.3. *Obdukcija (makroskopska analiza)*

Sve životinje korištene u studiji moraju se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj analizi koja uključuje pažljivi pregled vanjske površine tijela, svih otvora, te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. S jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, testisa, epididimisa (pasjemenika), jajnika, maternice, tiroidne žlijezde (štitnjače) (s paratiroidnim žlijezdama) timusa (prsne žlijezde), slezene, mozga i srca svih životinja (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili se neplanirano usmrte tijekom pokusa) treba obrezati svo okolno tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon sekcije, kako bi se izbjeglo sušenje organa.

▼B

Slijedeća tkiva treba sačuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve velike lezije, mozak (reprezentativne regije, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu (s tri područja: cervikalnog (vratnog), srednjeg torakalnog (prsnog) i lumbalnog (slabinskog)), hipofizu, oči, tiroidnu žlijezdu (štitnjaču), paratiroidnu žlijezdu, timus (prsnu žlijezdu), jednjak, žlijezde slinovnice, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, žučni mjehur, gušteraču, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, dušnik i pluća, aortu, spolne žlijezde, maternicu, pomoćne spolne organe, mliječnu žlijezdu ženke, prostatu, mokraćni mjehur, limfne čvorove (po mogućnosti, jedan koji pokriva put unosa ispitivane tvari u organizam i drugi koji je udaljen od puta unosa, kako bi se vidjeli sistemski učinci), periferni živac (bedreni (*n. ischiadicus*) ili tibijalni (*n. tibialis*)) po mogućnosti smješten uz mišić, odsječak koštane srži (ili svježi aspirat koštane srži) i kožu. Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve one organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane tvari smatra da bi mogli biti ciljni.

1.5.5.4. *Histopatologija*

Na sačuvanim organima i tkivima svih životinja iz kontrolne skupine i skupine tretirane visokim dozama treba napraviti kompletan histopatološki pregled. Ako se kod životinja na koje su primijenjene visoke doze ispitivane tvari primijete promjene, tada histopatološkim pregledom treba obuhvatiti i životinje iz svih ostalih skupina.

Treba pregledati sve veće lezije.

Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled onih tkiva i organa na kojima su kod tretiranih životinja primijećene promjene.

2. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

2.1. PODACI

Podatke treba prikazati za svaku životinju pojedinačno. Osim toga, najbolje ih je rezimirati u obliku tablice u kojoj za svaku pokusnu skupinu treba navesti broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule ili su iz humanih razloga bile usmrćene tijekom ispitivanja, vrijeme smrti ili humanog usmrćivanja, broj životinja kod kojih su opaženi znakovi toksičnosti, opis opažanih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i stupanj svih toksičkih učinaka, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i postotak životinja koje pokazuju određene vrste lezija.

Tamo gdje je to moguće, sve rezultate treba analizirati uz primjenu odgovarajuće opće prihvatljive statističke metode. Statističke metode i podatke koji će se analizirati treba odabrati još u fazi planiranja studije.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

▼B

2.2.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalni oblik (agregatno stanje), čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci,

— nosač (ovisno o slučaju): dokaz opravdanosti odabira nosača, ako se ne radi o vodi.

2.2.2. **Vrsta pokusnih životinja:**

— korištena životinjska vrsta i soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku ispitivanja.

2.2.3. **Uvjeti ispitivanja:**

— obrazloženje za odabir visina doza,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,

— podaci o primjeni ispitivane tvari,

— stvarne doze (mg/kg tjelesne težine/dan) i faktor za preračunavanje koncentracije ispitivane tvari u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, prema potrebi,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

2.2.4. **Rezultati:**

— tjelesna masa i promjene u tjelesnoj masi,

— unos hrane i unos vode, prema potrebi,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i visini doza, uključujući znakove toksičnosti,

— vrsta, stupanj i trajanje opaženih kliničkih promjena (jesu li reverzibilne ili nisu),

— rezultati oftalmološkog pregleda,

— hematološka ispitivanja s relevantnim normalnim vrijednostima,

— klinička biokemijska ispitivanja s relevantnim normalnim vrijednostima,

— tjelesna masa nakon smrti, masa organa, te omjer mase organa i tjelesne mase,

— nalazi obdukcije,

— detaljni opis svih histopatoloških nalaza,

— podaci o apsorpciji, ako postoje,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

▼B

B.28. **TEST SUBKRONIČNE DERMALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNO ISPITIVANJE DERMALNE TOKSIČNOSTI NA GLODAVCIMA UZ PRIMJENU PONAVLJANIH DOZA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana se tvar svakodnevno i u sve većim dozama nanosi na kožu nekoliko skupina pokusnih životinja, po jedna doza po skupini tijekom 90 dana. Za vrijeme primjene životinje se svakodnevno promatraju radi uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu tijekom ispitivanja obavlja se obdukcija, a po završetku ispitivanja, preživjele se životinje usmrćuju i također obduciraju.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Priprema**

Životinje se drže u pokusnim uvjetima s obzirom na smještaj i hranu najmanje pet dana prije ispitivanja. Zdrave mlade životinje prije ispitivanja se nasumce odabiru i raspoređuju u skupine koje će se tretirati i u kontrolne skupine. Neposredno prije ispitivanja na leđnom dijelu trupa životinja ošiša se dlaka. Dlaka se može i obrijati, ali to se mora učiniti oko 24 sata prije početka ispitivanja. Šišanje, odnosno brijanje, obično treba ponavljati u tjednim intervalima. Pri šišanju ili brijanju dlake treba paziti da se ne ošteti površina kože. Za nanošenje ispitivane tvari dlaku treba ukloniti s najmanje 10 % tjelesne površine. Kad se odlučuje o veličini površine s koje će biti uklonjena dlaka i o dimenzijama obloga treba uzeti u obzir tjelesnu masu životinje. Pri ispitivanju krutih tvari koje se prema potrebi mogu usitniti u prah, ispitivanu tvar treba u dovoljnoj mjeri navlažiti vodom ili, tamo gdje je to potrebno, odgovarajućim nosačem, kako bi se osigurao dobar kontakt s kožom. Tekuće ispitivane tvari obično se koriste nerazrijeđene. Ispitivana tvar primjenjuje se pet do sedam dana tjedno.

1.6.2. *Uvjeti ispitivanja*

1.6.2.1. Pokusne životinje

Može se upotrijebiti odrasli štakor, zec ili zamorac. Mogu se koristiti i druge vrste, ali pod uvjetom da za to postoji znanstveno opravdanje. Kada se prije dugotrajnog ispitivanja preliminarno obavlja ispitivanje subkronične dermalne toksičnosti, u oba ispitivanja treba upotrijebiti životinje iste vrste i istog soja.

▼B

1.6.2.2. Broj i spol

Za ispitivanje svake visine doze treba upotrijebiti najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka). Ženke ne smiju prethodno imati potomstvo i ne smiju biti gravidne. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, prije završetka studije, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđen za takvo usmrćivanje. Osim toga, jedna satelitska skupina od 20 životinja (10 životinja svakog spola) može se 90 dana tretirati visokom dozom i nakon tretiranja 28 dana opažati s obzirom na reverzibilnost, trajanje ili odgođenu pojavu toksičkih učinaka.

1.6.2.3. Visine doza

Potrebne su najmanje 3 visine doza s jednom kontrolom ili, ako se koristi otapalo, s kontrolom koju čini otapalo. Izlaganje treba trajati najmanje šest sati dnevno. Ispitivanu tvar treba nanositi u približno isto vrijeme svaki dan, uz povremena podešavanja (u tjednim ili dvotjednim intervalima) kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Izuzimajući tretiranje ispitivanom tvari, sa životinjama iz kontrolne skupine treba postupati na jednak način kao sa životinjama koje se podvrgavaju testiranju. Ako se radi lakšeg doziranja koristi nosač, kontrolnoj skupini na koju se primjenjuje nosač doze se daju na jednak način kao i tretiranim skupinama i one moraju primiti iste količine kao skupina tretirana najvišom dozom. Najviša doza treba izazvati toksičke učinke, ali smrtnih ishoda ne smije biti ili se mogu javiti u rijetkim slučajevima. Najniža doza ne bi smjela izazvati nikakve znakove toksičkog učinka. Tamo gdje postoji primjenljiva procjena razine ljudske izloženosti, najniža koncentracija treba biti malo viša od te procijenjene razine. U idealnom slučaju, srednja bi koncentracija trebala proizvesti minimalne vidljive toksičke učinke. Ako se koristi više od jedne međudoze, one se moraju primjenjivati u intervalima kako bi se njihovi toksički učinci mogli stupnjevati. U skupinama tretiranim niskim i srednjim dozama i u kontrolnim skupinama, stopa smrtnosti treba biti niska da bi ocjena rezultata uopće imala smisla.

Ako primjena ispitivane tvari izazove tešku nadraženost kože, koncentracije treba smanjiti, što može dovesti do smanjenja ili izostanka drugih toksičkih učinaka kod primjene visokih doza. Ako dođe do jakog oštećenja kože, možda će trebati prekinuti studiju i započeti novu s nižim koncentracijama.

1.6.3. Granični test

Ako u preliminarnom ispitivanju primjena doze od 1 000 mg/kg ili više doze vezane uz moguću ljudsku izloženost, ako je poznata, ne proizvede nikakve toksičke učinke, daljnje ispitivanje smatra se nepotrebnim.

1.6.4. Razdoblje opažanja

Opažanje pokusnih životinja radi otkrivanja znakova toksičnosti treba provoditi svakodnevno. Vrijeme smrti kao i vrijeme pojave i nestanka znakova toksičnosti treba zabilježiti.

▼B

1.6.5. Postupak

Životinje se u kaveze smještaju pojedinačno. U idealnim uvjetima, životinje se tretiraju sedam dana u tjednu, kroz vremensko razdoblje od 90 dana.

Životinje iz bilo koje satelitske skupine koje su predviđene za dodatna opažanja treba držati dodatnih 28 dana bez tretiranja kako bi se utvrdio oporavak od toksičkih učinaka ili njihova trajnost. Izlaganje treba trajati najmanje šest sati dnevno.

Ispitivanu tvar treba jednakomjerno nanijeti na površinu koja čini približno 10 % ukupne tjelesne površine. Kod jako toksičnih tvari površina na koju se tvar nanosi može biti i manja, ali čim veći dio te površine treba prekriti što tanjim i jednakomjernijim slojem.

Tijekom izlaganja ispitivana tvar se drži u kontaktu s kožom pomoću poroznog obloga od gaze i samoljepive trake koja ne nadražuje kožu. Ispitnu površinu treba dodatno prekriti na odgovarajući način kako bi oblog i ispitivana tvar ostali na mjestu i kako bi se osiguralo da životinje ne mogu ispitivanu tvar unijeti oralno. Da bi se životinju spriječilo da ispitivanu tvar unese oralnim putem mogu se upotrijebiti pomagala za sputavanje, ali potpuna imobilizacija nije preporučena metoda.

Na kraju razdoblja izloženosti ostatke ispitivane tvari treba ukloniti, ako je moguće vodom ili primjenom neke druge prikladne metode čišćenja kože.

Sve životinje treba opažati svaki dan i bilježiti znakove toksičnosti, navodeći vrijeme njihove pojave, stupanj i trajanje. Opažanje životinja u kavezu treba obuhvaćati promjene na koži i dlaci, očima i sluznicama, na dišnom i cirkulacijskom sustavu, te na autonomnom i centralnom živčanom sustavu, kao i promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i obrascu ponašanja. Unos hrane treba mjeriti na tjednoj osnovi i životinje treba svaki tjedan vagati. Redovito je opažanje životinja neophodno da bi se spriječio gubitak životinja uslijed kanibalizma, autolize tkiva ili pogrešnog smještanja. Na kraju studije sve se preživjele životinje iz nesatelitskih tretiranih skupina usmrćuju i podvrgavaju obdukciji. Životinje na umoru i životinje koje trpe jaki stres ili bol treba po uočavanju izlučiti, humano usmrtiti i obducirati.

Na kraju ispitivanja na svim životinjama, uključujući i kontrolne životinje, obavljaju se sljedeći pregledi:

(a) oftalmološki pregled pomoću oftalmoskopa ili druge odgovarajuće opreme, koji treba obaviti prije primjene ispitivane tvari i po završetku studije, najbolje na svim životinjama, ili barem u skupinama koje primaju visoke doze i kontrolnim skupinama. Ako se otkriju promjene na očima, treba pregledati sve životinje;

(b) hematološke pretrage koje uključuju hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita i mjerenje sposobnosti zgrušavanja koje obuhvaća vrijeme zgrušavanja, protrombinsko vrijeme, tromboplastinsko vrijeme, ili broj tromocita, treba obaviti na kraju ispitnog razdoblja;

▼B

(c) kliničke biokemijske pretrage krvi treba obaviti na kraju ispitnog razdoblja. Područja ispitivanja koja se smatraju primjerenim za sve studije obuhvaćaju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljikohidrata, funkciju jetre i bubrega. Izbor konkretnih testova koji će se obavljati ovisit će o načinu djelovanja ispitivane tvari. Predlaže se utvrđivanje razina kalcija, fosfora, klorida, natrija, kalija, glukoze natašte (uz trajanje posta primjereno predmetnoj životinjskoj vrsti) serumske glutamat-piruvat transaminaze ([1]), serumske glutamat-oksaloacetat transaminaze ([2]), ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, dušika u ureji, albumina, kreatinina u krvi, ukupnog bilirubina i ukupnih serumskih bjelančevina. Ostale pretrage koje mogu biti potrebne radi donošenja odgovarajuće toksikološke ocjene obuhvaćaju analizu lipida, hormona, acido-bazne ravnoteže, methemoglobina i aktivnosti kolinesteraze. Ako istraživanje opaženih učinaka treba proširiti, prema potrebi se mogu uvesti dodatna klinička biokemijska ispitivanja;

(d) pretraga urina nije dio uobičajene prakse i obavlja se samo ako je indicirana na temelju očekivane ili opažene toksičnosti.

Ako podaci o normalnim vrijednostima korišteni u prijašnjim pokusima nisu adekvatni, treba razmotriti koje hematološke i kliničke biokemijske parametre treba utvrditi prije doziranja.

Obdukcija (makroskopska analiza)

Sve životinje treba podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj analizi koja uključuje pažljivi pregled vanjske površine tijela, svih otvora, te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. S jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, testisa, sjemenovoda, timusa, slezene, mozga i srca svih životinja treba obrezati svo okolno tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon sekcije, kako bi se izbjeglo sušenje organa. Slijedeće organe i tkiva treba čuvati u odgovarajućem mediju za mogući kasniji histopatološki pregled: sve velike lezije, mozak – uključujući odsječke medule/mosta, kore malog i velikog mozga, hipofize, štitanjače/paratiroidne žlijezde, tkivo prsne žlijezde, (dušnik), pluća, srce, aortu, žlijezde slinovnice, jetru, slezenu, bubrege, nadbubrežne žlijezde, gušteraču, spolne žlijezde, maternicu, pomoćne spolne organe, žučni mjehur (ako postoji), jednjak, želudac, dvanaesnik, tašto crijevo, vito crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo, rektum, mokraćni mjehur, reprezentativni limfni čvor (žensku mliječnu žlijezdu), (muskulaturu bedra), periferni živac, (oči), (prsnu kost s koštanom srži), (bedrenu kost – uključujući površinu zgloba), (leđnu moždinu na tri razine: vratnoj, srednjoj prsnoj i slabinskoj) i (eksorbitalne suzne žlijezde). Tkiva navedena u zagradama treba pregledati samo ako na to ukazuju znakovi toksičnosti ili ako su u pitanju ciljni organi.

Histopatološki pregled

(a) Kompletne histopatološke pretrage treba napraviti na normalnoj i tretiranoj koži i na organima i tkivima životinja iz kontrolne skupine i skupine tretirane visokom dozom.

(b) Treba pregledati sve velike lezije.

([1]) Sada poznata kao serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Sada poznata kao aspartat aminotransferaza.

▼B

(c) Treba pregledati ciljne organe kod skupina tretiranih ostalim dozama.

(d) Ako se koriste štakori, pluća životinja iz skupina tretiranih niskim i srednjim dozama treba podvrgnuti histopatološkim pregledu radi otkrivanja dokaza o mogućim infekcijama, budući da se na taj način može donijeti odgovarajuća ocjena zdravstvenog stanja životinja. Uobičajena praksa ne nalaže daljnje histopatološke pretrage na životinjama iz tih skupina, ali moraju se uvijek obaviti na organima životinja iz skupine tretirane visokom dozom, na kojima su vidljivi znakovi lezija.

(e) Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled onih tkiva i organa na kojima su kod ostalih tretiranih skupina primijećene promjene.

2. **PODACI**

Podatke treba rezimirati u obliku tablice u kojoj će za svaku testiranu skupinu životinja biti naveden broj životinja na početku ispitivanja i broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrste lezija i za svaku vrstu lezija postotak životinja kod kojih su utvrđene. Dobivene rezultate treba analizirati prema odgovarajućoj statističkoj metodi. Može se koristiti bilo koja priznata statistička metoda.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati sljedeće informacije:

— vrsta, soj i podrijetlo životinja, okolišni uvjeti, prehrana,

— uvjeti ispitivanja,

— visine doza (uključujući nosač, ako se koristio) i koncentracije,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i dozi,

— razina kod koje nema toksičkih učinaka, tamo gdje je to moguće,

— vrijeme smrti tijekom studije, odnosno podaci o preživljavanju životinja do kraja ispitivanja,

— opis toksičkih i drugih učinaka,

— vrijeme opažanja svakog znaka abnormalnosti i daljnjih promjena,

— podaci o hrani i tjelesnoj masi,

— oftalmološki nalazi,

— obavljena hematološka ispitivanja i svi rezultati,

— obavljena klinička biokemijska ispitivanja i svi rezultati (uključujući rezultate svih analiza urina),

— nalazi obdukcije,

▼B

— detaljni opis svih histopatoloških nalaza,

— statistička obrada rezultata tamo gdje je to moguće,

— diskusija o rezultatima.

3.2. OCJENA I TUMAČENJE REZULTATA

Vidjeti Opći uvod, dio B.

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B.

▼M4

B.29. SUBKRONIČNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST: 90-DNEVNA STUDIJA

SAŽETAK

Ova revidirana ispitna metoda B.29 osmišljena je za potpunu karakterizaciju toksičnosti ispitivane kemikalije inhalacijom u subkroničnom trajanju (90 dana) te za pružanje podataka za procjenu kvantitativnog rizika od inhalacije. Skupine od deset mužjaka i deset ženki glodavaca izlažu se šest sati dnevno 90 dana (13 tjedana) a) ispitivanoj kemikaliji na tri ili više razina koncentracije, b) filtriranom zraku (negativna kontrola) i/ili c) nosaču (kontrola nosača). Životinje se općenito izlažu pet dana tjedno, ali također je dopušteno i izlaganje sedam dana tjedno. Uvijek se ispituju mužjaci i ženke, ali se oni mogu izlagati različitim razinama koncentracije ako je poznato da je jedan od spolova osjetljiviji na ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje. Ova metoda voditelju istraživanja omogućuje fleksibilnost uključivanja satelitskih (reverzibilnih) skupina, usmrćivanja u međuvremenu, bronhoalveolarnog ispiranja (BAL), neuroloških ispitivanja te dodatnih kliničko-patoloških i histopatoloških procjena s ciljem bolje karakterizacije toksičnosti ispitivane kemikalije.

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a 413 (2009.). Originalna Smjernica za ispitivanje 413 (TG 413) usvojena je 1981 (1). Ova ispitna metoda B.29 (kao ekvivalent revidirane TG 413 (2009)) ažurirana je kako bi odrazila stanje znanosti te kako bi ispunila aktualne i buduće regulatorne potrebe.

2. Studije subkronične inhalacijske toksičnosti primarno se primjenjuju radi određivanja regulatornih koncentracija za određivanje rizika po radnike u radnim uvjetima. Također se primjenjuju za određivanje rezidencijalnih rizika po ljude, transport te okoliš. Ova metoda omogućuje karakterizaciju štetnih učinaka nakon ponovljenog svakodnevnog inhalacijskog izlaganja ispitivanoj kemikaliji tijekom 90 dana (otprilike 10 % životnog vijeka štakora). Podaci dobiveni iz studija subkronične inhalacijske toksičnosti mogu se upotrijebiti za procjenu kvantitativnog rizika te za odabir koncentracija za kronične studije. Ova ispitna metoda nije specijalno namijenjena testiranju nanomaterijala. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog poglavlja i u Smjernici (GD) 39 (2).

UVODNA RAZMATRANJA

3. Ispitni laboratorij mora u obzir uzeti sve raspoložive informacije o ispitivanoj kemikaliji prije provođenja studije kako bi povećao kvalitetu istraživanja i na minimum sveo primjenu životinja. Informacije koje će pomoći u odabiru najprikladnijih ispitnih koncentracija mogu obuhvaćati identitet, kemijsku strukturu te fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije; rezultate bilo kakvih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo*; očekivanu uporabu i potencijal za izlaganje ljudi; dostupne podatke (Q)SAR i toksikološke podatke o tvarima srodne strukture te podatke dobivene ostalim istraživanjima s ponovljenim izlaganjem. Ako se tijekom studije očekuje ili uoči neurotoksičnost, voditelj istraživanja može odlučiti da obuhvati prikladne procjene kao što su serije funkcionalnih opažanja (FOB) te mjerenje motoričke aktivnosti. Iako određivanje vremena izlaganja u svezi sa specifičnim ispitivanjima može biti ključno, obavljanje tih dodatnih aktivnosti ne bi trebalo utjecati na osnovni plan studije.

▼M4

4. Razrijeđene nagrizajuće ili nadražujuće ispitivane kemikalije mogu se ispitivati na koncentracijama koje će proizvesti željeni stupanj toksičnosti. Za više informacija pogledajte GD 39 (2). Kada se životinje izlažu tim materijalima, ciljane koncentracije moraju biti dovoljno niske da ne bi izazvale značajnu patnju ili stres, ali biti dovoljno visoke za proširenje krivulje koncentracije i reakcije na razine koje ispunjavaju regulatorni i znanstveni cilj ispitivanja. Te koncentracije treba odabirati u svakom pojedinom slučaju, najbolje na temelju odgovarajuće isplanirane studije za utvrđivanje raspona koja pruža informacije o kritičnim krajnjim učincima, pragu nadraženosti te vremenu pojavljivanja (vidjeti stavke 11. - 13.). Treba pružiti obrazloženje za odabir koncentracija.

5. Životinje u stanju ugibanja ili životinje koje očito trpe bol ili pokazuju znakove ozbiljnog stresa treba humano usmrtiti. Životinje u stanju ugibanja uzimaju se u obzir jednako kao i životinje koje uginu pri ispitivanju. Kriteriji za odlučivanje o usmrćivanju životinja u stanju ugibanja ili koje teško pate te upute o prepoznavanju predvidive ili prijeteće smrti predmet su Smjernice za humano usmrćivanje br. 19 OECD-a (3).

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

6. Treba upotrijebiti zdrave, mlade odrasle glodavce sojeva koji se obično koriste u laboratorijima. Prednost se daje vrsti štakora. U slučaju primjene drugih vrsta treba priložiti obrazloženje.

Priprema životinja

7. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na dan nasumičnog odabira životinje moraju biti mlade odrasle jedinke u dobi između sedam i devet tjedana. Tjelesna masa mora biti u rasponu ± 20 % prosječne mase svakog spola. Životinje se nasumično odabiru, označavaju radi pojedinačne identifikacije te drže u kavezima najmanje pet dana prije početka ispitivanja kako bi im se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uvjete.

Uzgoj životinja

8. Životinje treba pojedinačno identificirati, po mogućnosti potkožnim transponderima, kako bi se olakšalo opažanje i izbjegla zamjena. Temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi iznositi 22 ± 3 °C. Relativna vlažnost zraka idealno bi se morala održavati u rasponu od 30 do 70 % iako to možda neće biti moguće kad se kao nosač primjenjuje voda. Prije i nakon izlaganja životinje općenito treba smjestiti u kaveze u skupinama po spolu i koncentraciji, ali broj životinja po kavezu ne smije ometati jasna opažanja svake životinje i tako se trebaju na minimum svesti gubici zbog kanibalizma i borbe. Ako izlaže samo nos životinja, može biti potrebno aklimatizirati životinje na cijevi koje ih sputavaju. Cijevi koje sputavaju životinje ne smiju im nametnuti pretjeran fizički, toplinski ili imobilizacijski stres. Sputavanje može utjecati na fiziološke krajnje učinke, poput tjelesne temperature (hipertermija) i/ili respiratornog minutnog volumena. Ako su dostupni generički podaci koji pokazuju da se takve promjene ne događaju u znatnom opsegu, nije potrebna prethodna prilagodba cijevima koje sputavaju. Životinje, koje su cijelim tijelom izložene aerosolu, tijekom izlaganja treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječilo da se ispitivani aerosol filtrira kroz krzno drugih životinja u istom kavezu. Može se upotrijebiti konvencionalna i certificirana laboratorijska prehrana, osim tijekom izlaganja, u kombinaciji s neograničenom zalihom javne pitke vode. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka.

▼M4

Komore za inhalaciju

9. Pri odabiru komore za inhalaciju u obzir valja uzeti narav ispitivane kemikalije i predmet ispitivanja. Prednost se daje metodi izlaganja samo nosom (koja uključuje samo glavu, samo nos ili samo njušku). Izlaganju samo nosom općenito se daje prednost za ispitivanja tekućih ili krutih aerosola te para koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Posebni ciljevi ispitivanja mogu se bolje postići uporabom izlaganja čitavog tijela, ali to treba opravdati u izvješću o ispitivanju. Kako bi se osigurala stabilnost atmosfere u slučaju primjene komore za čitavo tijelo, ukupni volumen pokusnih životinja ne smije premašiti 5 % volumena komore. Načela tehnika izlaganja samo nosom i čitavim tijelom te njihove specifične prednosti i nedostaci navedeni su u GD 39 (2).

STUDIJE TOKSIČNOSTI

Granične koncentracije

10. Za razliku od akutnih studija, u studijama subkronične inhalacijske toksičnosti nema određenih graničnih koncentracija. Maksimalna ispitna koncentracija treba uzeti u obzir: 1) maksimalnu koncentraciju koja se može postići, 2) razinu za izlaganje ljudi s „najgorim scenarijem ”, 3) potrebu za održavanjem odgovarajuće opskrbe kisikom i/ili 4) pretpostavke za dobrobit životinja. U nedostatku ograničenja na temelju podataka mogu se upotrijebiti akutne granice iz Uredbe (EZ) br. 1272/2008 (13) (tj. do maksimalne koncentracije od 5 mg/l za aerosole, 20 mg/l za pare i 20 000 ppm za plinove); vidjeti GD 39 (2). Ako je potrebno premašiti te granice pri ispitivanju plinova ili vrlo hlapljivih ispitivanih kemikalija (npr. rashladnih sredstava), treba priložiti obrazloženje. Granična koncentracija trebala bi izazvati nedvojbenu toksičnost, a da pritom ne izazove pretjerani stres za životinje ili utječe na njihovu dugovječnost (3).

Studija za utvrđivanje raspona

11. Prije početka glavne studije općenito je potrebno provesti studiju za utvrđivanje raspona. Studija za utvrđivanje raspona opsežnija je od preliminarne studije jer nije ograničena na odabir koncentracije. Znanje prikupljeno u studiji za utvrđivanje raspona može dovesti do uspješne glavne studije. Studija za utvrđivanje raspona može, primjerice, pružiti tehničke informacije u svezi s analitičkim metodama, određivanjem veličine čestica, otkrivanjem toksičnih mehanizama, kliničko-patološkim i histopatološkim podacima i procjenama mogućih NOAEL i MTC koncentracija u glavnoj studiji. Voditelj istraživanja može odlučiti primijeniti studiju za utvrđivanje raspona radi identifikacije praga nadraženosti respiratornog trakta (npr. s histopatologijom respiratornog trakta, ispitivanjem plućnih funkcija ili bronhoalveolarnim ispiranjem), gornje koncentracije koja se tolerira bez prekomjernog stresa za životinje i parametara koji će najbolje okarakterizirati toksičnost ispitivane kemikalije.

12. Studija za utvrđivanje raspona može obuhvaćati jednu ili više razina koncentracije. Ovisno o odabranim krajnjim učincima, tri do šest mužjaka i tri do šest ženki treba izložiti svakoj razini koncentracije. Studija za utvrđivanje raspona treba trajati najmanje pet dana i općenito ne dulje od 28 dana. U izvješću o studiji treba pružiti argumentaciju za odabir koncentracije za glavnu studiju. Cilj glavne studije jest pokazati odnos koncentracije i reakcije temeljen na očekivanjima za najosjetljiviji krajnji učinak. Niska koncentracija idealno bi trebala biti koncentracija s neopaženim štetnim učincima dok visoka koncentracija treba izazvati nedvojbenu toksičnost bez izazivanja pretjeranog stresa za životinje ili bez utjecaja na njihovu dugovječnost (3).

▼M4

13. Pri odabiru razina koncentracije za studiju za utvrđivanje raspona u obzir treba uzeti sve raspoložive informacije uključujući odnose strukture i aktivnosti te podatke za slične kemikalije (vidjeti stavak 3.). Studija za utvrđivanje raspona može potvrditi/opovrgnuti mehanistički utemeljene krajnje učinke koje se smatra najosjetljivijima, npr. inhibiciju kolinesteraze organofosfatima, formaciju methemoglobina eritrocitotoksičnim agensima, hormone štitnjače (T_3, T_4) za tirotoksikante, proteine, LDH ili neutrofile u bronhoalveolarnom ispiranju za neškodljive, slabo topljive čestice ili aerosole koji nadražuju pluća.

Glavna studija

14. Glavna studija subkronične toksičnosti općenito obuhvaća tri razine koncentracije, kao i, po potrebi, paralelnu negativnu kontrolu (zrak) i/ili kontrolu nosača (vidjeti stavak 18.). Sve raspoložive podatke treba upotrijebiti kao pomoć pri odabiru odgovarajućih razina izlaganja, uključujući rezultate sustavnih studija toksičnosti, metabolizma i kinetike (poseban naglasak treba staviti na izbjegavanje visokih razina koncentracije koje zasićuju kinetičke procese). Svaka ispitna skupina sadrži deset mužjaka i deset ženki glodavaca koji se izlažu ispitivanoj kemikaliji šest sati dnevno pet dana tjedno u razdoblju od 13 tjedana (ukupno trajanje studije najmanje 90 dana). Životinje se mogu također izlagati i sedam dana tjedno (npr. kada se ispituju inhalirani lijekovi). Ako je za jedan od spolova poznato da je osjetljiviji na ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje, spolovi se mogu izlagati različitim razinama koncentracije kako bi se optimizirao odnos koncentracije i reakcije, kao što je opisano u stavku 15. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanje izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Ako se primjenjuje izlaganje kraće od šest sati dnevno ili ako je potrebno provesti dugotrajno izlaganje (npr. 22 sata dnevno) u sklopu studije izlaganja čitavim tijelom (vidjeti GD 39 (2)), treba pružiti argumente. Tijekom izlaganja treba obustaviti davanje hrane osim ako izlaganje nije dulje od šest sati. Voda se može davati tijekom cijelog izlaganja čitavim tijelom.

15. Odabrane ciljane koncentracije moraju identificirati ciljni(-e) organ(-e) i pokazati jasan odnos koncentracije i reakcije:

— Visoka razina koncentracije trebala bi rezultirati toksičnim učincima, ali ne izazvati znakove dugotrajnosti ili smrtnosti koji bi spriječili suvislu ocjenu.

— Srednju(-e) razinu(-e) koncentracije trebalo bi prorijediti kako bi se proizvelo stupnjevanje toksičnih učinaka između visoke i niske koncentracije.

— Niska koncentracija treba pružiti malo ili nimalo dokaza o toksičnosti.

Usmrćivanje u međuvremenu

16. Ako se planiraju usmrćivanja u međuvremenu, broj životinja na svakoj razini izlaganja treba povećati za broj životinja usmrćenih prije završetka studije. Treba navesti argumentaciju za primjenu usmrćivanja u međuvremenu i valja ga prikladno razjasniti statističkim analizama.

▼M4

Satelitska (reverzibilna) studija

17. Satelitska (reverzibilna) studija može se primijeniti kako bi se promatrala reverzibilnost, postojanost ili zakašnjelo pojavljivanje toksičnosti u razdoblju nakon tretiranja, odgovarajućeg trajanja, ali ne kraćeg od 14 dana. Satelitske (reverzibilne) skupine sastoje se od deset mužjaka i deset ženki koji se izlažu istodobno s pokusnim životinjama u glavnoj studiji. Skupine za satelitsku (reverzibilnu) studiju treba izlagati ispitivanoj kemikaliji na najvišoj razini koncentracije i moraju se provoditi paralelne kontrole zraka i/ili nosača (vidjeti stavak 18.).

Kontrolne životinje

18. Sa životinjama iz paralelnih negativnih kontrola (zrak) treba postupati na jednak način kao i sa životinjama iz ispitne skupine osim što ih se izlaže filtriranom zraku, a ne ispitivanoj kemikaliji. Ako se voda ili druga tvar primjenjuje kao pomoć u stvaranju ispitne atmosfere, u studiju treba uključiti kontrolni nosač umjesto negativne (zrak) kontrolne skupine. Kada god je to moguće, kao nosač treba upotrebljavati vodu. Kada se kao nosač koristi voda, životinje iz kontrolne skupine treba izlagati zraku jednake relativne vlažnosti kao i izložene skupine. Odabir prikladnog nosača treba se temeljiti na prikladno provedenoj predstudiji ili povijesnim podacima. Ako nije poznata toksičnost medija, voditelj istraživanja može odlučiti da upotrijebi negativnu (zrak) kontrolu i kontrolu nosača, ali to se izričito destimulira. Ako povijesni podaci pokažu da nosač nije toksičan, nema potrebe za negativnom (zrak) kontrolnom skupinom i treba rabiti samo kontrolu nosača. Ako predstudija ispitivane kemikalije formulirane u nosaču ne pokaže nikakvu toksičnost, znači da nosač nije toksičan u ispitnoj koncentraciji te stoga ne treba provoditi kontrolu nosača.

UVJETI IZLAGANJA

Primjena koncentracija

19. Životinje se izlažu ispitivanoj kemikaliji u vidu plina, pare, aerosola ili njihovih smjesa. Fizikalno stanje koje će se ispitivati ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, odabranim koncentracijama i/ili fizikalnom stanju koje je obično prisutno tijekom manipulacije ispitivanom kemikalijom i njezine uporabe. Higroskopske i kemijski reaktivne ispitivane kemikalije treba ispitivati u uvjetima suhog zraka. Treba paziti kako bi se izbjeglo stvaranje eksplozivnih koncentracija. Materijali u česticama mogu se podvrgnuti mehaničkim procesima radi smanjenja veličine čestica. Ostale upute nalaze se u GD 39 (2).

Distribucija veličine čestica

20. Određivanje veličine čestica treba provesti za sve aerosole i pare koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Kako bi se omogućilo izlaganje svih relevantnih područja respiratornog trakta, preporuča se aerosol sa srednjim aerodinamičkim promjerom čestica (MMAD) u rasponu od 1 do 3 μm s geometrijskom standardnom devijacijom (σ_g) u rasponu od 1,5 do 3,0 (4). Iako treba učiniti razuman napor za postizanje tih standarda, ako se ne mogu postići, treba podnijeti stručno mišljenje. Primjerice, metalne čestice u isparini mogu biti manje od tog standarda, a napunjene čestice i vlakna mogu biti veći.

▼M4

Priprema ispitivane kemikalije u nosaču

21. Idealno bi bilo da se ispitivana kemikalija ispituje bez nosača. Ako je potrebno primijeniti nosač za stvaranje odgovarajuće koncentracije ispitivane tvari i veličine čestica, prednost treba dati vodi. Kad god se ispitivana kemikalija otapa u nosaču, treba dokazati njegovu stabilnost.

PRAĆENJE UVJETA IZLAGANJA

Protok zraka u komori

22. Protok zraka u komori za izlaganje treba pažljivo kontrolirati, neprestano nadzirati te bilježiti najmanje jedanput u sat vremena tijekom svakog izlaganja. Nadziranje koncentracije (ili privremene stabilnosti) u ispitnoj atmosferi, provedeno u stvarnom vremenu, sastavna je mjera svih dinamičkih parametara i pruža neizravno sredstvo za kontrolu svih relevantnih parametara dinamičke inhalacije. Ako se koncentracija nadzire u stvarnom vremenu, učestalost mjerenja protoka zraka može se smanjiti na jedno mjerenje po izlaganju dnevno. Posebnu pozornost treba obratiti na izbjegavanje ponovnog udisanja u komorama za izlaganje samo nosom. Koncentracija kisika mora iznositi najmanje 19 %, a koncentracija ugljikova dioksida ne smije premašivati 1 %. Ako postoji opravdana sumnja da se takav standard ne može postići, treba mjeriti koncentraciju kisika i ugljikova dioksida. Ako mjerenja prvog dana izlaganja pokažu da su plinovi na pravilnoj razini, nisu potrebna daljnja mjerenja.

Temperatura i relativna vlažnost zraka u komori

23. Temperaturu u komori treba održavati na 22 ± 3 °C. Relativnu vlažnost zraka u području udisanja životinja za izlaganje samo nosom i čitavim tijelom treba neprestano nadzirati i bilježiti svakoga sata tijekom svakog izlaganja kad je to moguće. Relativnu vlažnost zraka trebalo bi po mogućnosti održavati u rasponu od 30 do 70 %, no to može biti nemoguće (npr. u slučaju ispitivanja smjesa na bazi vode) ili nemjerljivo zbog utjecanja na ispitivanu kemikaliju pomoću ispitne metode.

Ispitivana kemikalija: Nazivna koncentracija

24. Kad god je to moguće, treba izračunati i zabilježiti nazivnu koncentraciju u komori za izlaganje. Nazivna koncentracija jest masa proizvedene ispitivane kemikalije podijeljena ukupnim volumenom zraka koji je prošao kroz sustav komore. Nazivna se koncentracija ne koristi za karakterizaciju izlaganja životinja nego usporedba nazivne koncentracije i stvarne koncentracije daje uvid u učinkovitost proizvodnje sustava ispitivanja te se stoga može upotrijebiti za otkrivanje problema pri proizvodnji.

Ispitivana kemikalija: Stvarna koncentracija

25. Stvarna koncentracija jest koncentracija ispitivane kemikalije uzorkovana u zoni udisanja životinja u komori za inhalaciju. Stvarne koncentracije mogu se dobiti specifičnim metodama (npr. izravnim uzorkovanjem, adsorpcijskim ili kemijskim reaktivnim metodama te analitičkom karakterizacijom nakon toga)ili nespecifičnim metodama poput gravimetrijske analize filtra. Primjena gravimetrijske analize prihvatljiva je samo za aerosole sa samo jednom komponentom u prahu ili aerosole tekućina niskog stupnja hlaplji-vosti i treba je podržati odgovarajućom preliminarnom karakterizacijom

▼M4

specifičnom za ispitivanu kemikaliju. Gravimetrijskom analizom može se odrediti i koncentracija aerosola s višekomponentnim prahom. No, za to su potrebni analitički podaci koji pokazuju da je sastav materijala koji se prenosi zrakom sličan početnom materijalu. Ako ta informacija nije dostupna, potrebna je ponovna analiza ispitivane kemikalije (idealno u stanju kada se prenosi zrakom) u pravilnim intervalima tijekom ispitivanja. Za agense, pod utjecajem aerosola, koji mogu ispariti ili sublimirati treba pokazati da su odabranom metodom skupljene sve faze.

26. Ako je moguće, tijekom trajanja studije treba upotrijebiti jednu partiju ispitivane kemikalije, a ispitivani uzorak treba skladištiti u uvjetima u kojima će biti očuvana njegova čistoća, homogenost i stabilnost. Prije početka studije treba odrediti svojstva ispitivane kemikalije, uključujući njezinu čistoću i, ako je tehnički izvedivo, identitet te količine identificiranih kontaminirajućih tvari i nečistoća. To se može pokazati sljedećim podacima, ali nije ograničeno na njih: vrijeme zadržavanja i relativno vršno područje, molekulska masa iz spektroskopskog mjerenja ili kromatografske analize plina ili sličnih procjena. Iako identitet ispitivanog uzorka nije odgovornost ispitnog laboratorija, za laboratorij može biti mudro barem u ograničenim okvirima potvrditi naručiteljevu karakterizaciju (npr. boju, fizikalno stanje itd.).

27. Atmosferu izlaganja treba održavati konstantnom koliko je god moguće. Uređaj za nadzor u stvarnom vremenu, kao što je fotometar za aerosol ili uređaj za analizu ukupnih ugljikovodika za paru može se upotrijebiti za dokazivanje stabilnosti uvjeta izlaganja. Stvarnu koncentraciju u komori treba mjeriti najmanje tri puta tijekom svakog dana izlaganja za svaku razinu izlaganja. Ako to nije izvedivo zbog ograničenog protoka zraka ili niskih koncentracija, prihvatljiv je jedan uzorak po razdoblju izlaganja. Uzorak se u idealnom slučaju uzima tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Pojedinačni uzorci koncentracije u komori ne smiju od srednje koncentracije u komori odstupati za više od ± 10 % za plinove i pare i ne za više od ± 20 % za tekućine ili kruti aerosol. Treba izračunati i zabilježiti vrijeme za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}). Trajanje izlaganja zahvaća vrijeme proizvodnje ispitivane kemikalije. Pritom se vodi računa o vremenu potrebnom za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}) i vremenu raspada. Smjernica za procjenu t_{95} može se pronaći u GD 39 (2).

28. Za vrlo složene smjese sastavljene od plinova/para i aerosola (npr. zapaljive atmosfere i i ispitivane kemikalije izbačene iz namjenskih proizvoda/uređaja za krajnju uporabu) svaka se faza može ponašati drukčije u komori za inhalaciju. Stoga treba odabrati najmanje jedan indikator (analiziranu tvar), obično glavni aktivni sastojak smjese, svake faze (plin/para i aerosol). Kada je ispitivana kemikalija smjesa, treba izvijestiti o analitičkoj koncentraciji ukupne smjese, a ne samo za aktivni sastojak ili indikator (analiziranu tvar). Dodatne informacije o stvarnim koncentracijama mogu se pronaći u GD 39 (2).

Ispitivana kemikalija: Distribucija veličine čestica

29. Distribuciju veličine čestica u aerosolu treba odrediti najmanje jedanput tjedno za svaku razinu koncentracije uporabom kaskadnog impaktora ili alternativnog instrumenta poput uređaja za aerodinamičku analizu veličine čestica (APS). Ako se može dokazati da su rezultati dobiveni kaskadnim impaktorom i alternativnim instrumentom ekvivalentni, u studiji se može upotrebljavati alternativni instrument.

▼M4

30. Drugi uređaj, poput gravimetrijskog filtra ili uređaja za sudaranje/uređaja za mjerenje mjehurića plina, treba upotrijebiti paralelno s primarnim instrumentom kako bi se potvrdila učinkovitost skupljanja primarnog instrumenta. Koncentracija mase dobivena analizom veličine čestica trebala bi biti u razumnim granicama koncentracije mase dobivene analizom filtracijom [vidjeti GD 39 (2)]. Ako se ekvivalentnost može dokazati na svim koncentracijama ispitanima u ranoj fazi istraživanja, mogu se izostaviti daljnja mjerenja radi potvrde. Radi dobrobiti životinja treba provoditi mjerenja kako bi se minimalizirali nedefinitivni podaci koji mogu izazvati potrebu za ponavljanjem studije.

31. Određivanje veličine čestica treba provesti za pare ako postoji ikakva mogućnost da bi kondenzacijom pare mogao nastati aerosol ili ako su u čestice otkrivene u atmosferi pare s potencijalom za miješane faze.

OPAŽANJA

32. Životinje treba klinički promatrati prije, tijekom i nakon razdoblja izlaganja. Češća opažanja mogu biti potrebna ovisno o reakciji životinja tijekom izlaganja. Ako primjena cijevi koje sputavaju, slabo osvijetljenih komora za čitavo tijelo ili neprozirna atmosfera ometaju opažanje na životinjama, opažanje treba pažljivo obaviti nakon izlaganja. Opažanja prije izlaganja sljedećeg dana mogu ocijeniti reverzibilnost ili pogoršanje toksičnih učinaka.

33. Sva se opažanja bilježe u pojedinačnim evidencijama za svaku životinju. Ako se životinje usmrte zbog humanih razloga ili ih se pronađe uginule, vrijeme ugibanja treba zabilježiti što je moguće preciznije.

34. Opažanja u kavezu moraju uključivati promjene na koži i krznu, očima i sluznicama te promjene u dišnom i cirkulacijskom sustavu, promjene u živčanom sustavu te promjene u somatomotoričkoj aktivnosti i uzorcima ponašanja. Treba obratiti pozornost na opažanje tremora, konvulzija, salivacije, dijareje, letargije, spavanja i kome. Mjerenje rektalne temperature može pružiti dodatne dokaze o refleksnoj bradipneji ili hipo/hipertermiji povezanoj s tretiranjem ili držanjem u zatvorenom. U protokol studije mogu se uključiti i dodatna određivanja, kao što su kinetika, biološki monitoring, funkcija pluća, retencija slabo topljivih materijala koji se nakupljaju u plućnom tkivu te promjene u ponašanju.

TJELESNA MASA

35. Pojedinačnu masu životinja treba zabilježiti kratko prije prvog izlaganja (0. dan) te zatim dvaput tjedno (na primjer: petkom i ponedjeljkom kako bi se dokazao oporavak preko vikenda bez izlaganja ili u vremenskim intervalima kako bi se omogućilo utvrđivanje sistemske toksičnosti) te u vrijeme ugibanja ili usmrćivanja. Ako u prva četiri tjedna nema učinaka, tijekom ostatka studije tjelesna se masa može mjeriti jedanput tjedno. Satelitske (reverzibilne) životinje (ako se koriste) treba nastaviti vagati jedanput tjedno tijekom čitavog razdoblja oporavka. Na kraju istraživanja sve životinje treba izvagati kratko prije usmrćenja kako bi se omogućilo nepristrano određivanje odnosa mase organa i tjelesne mase.

UNOS HRANE I VODE

36. Unos hrane treba mjeriti jedanput tjedno. Također se može mjeriti i unos vode.

▼M4

KLINIČKA PATOLOGIJA

37. Kliničko-patološke pretrage treba obaviti za sve životinje uključujući kontrolnu i satelitsku (reverzibilnu) skupinu u trenutku usmrćivanja. Treba zabilježiti vremensko razdoblje između kraja izlaganja i prikupljanja krvi, posebno ako je rekonstrukcija ciljanog krajnjeg učinka brza. Uzorkovanje nakon završetka izlaganja indicirano je za parametre s kratkim poluvremenom plazme (npr. COHb, CHE, i MetHb).

38. U tablici 1. navedeni su kliničko-patološki parametri koji se općenito traže za sva toksikološka ispitivanja. Analiza urina ne traži se rutinski, ali se može provesti ako se smatra korisnom na temelju očekivane ili opažene toksičnosti. Voditelj istraživanja može odlučiti da odredi i dodatne parametre radi bolje karakterizacije toksičnosti ispitivane kemikalije (npr. kolinesterazu, lipide, hormone, ravnotežu kiselina i lužina, methemoglobin ili Heinzova tjelešca, kreatin kinazu, omjer mijeloida i eritroida, troponin, plinove u arterijskoj krvi, laktat dehidrogenazu, sorbitol dehidrogenazu, glutamat dehidrogenazu i gama glutamil transpeptidazu).

Tablica 1.

Standardni kliničko-patološki parametri

Hematologija	
Broj eritrocita	Ukupni broj leukocita
Hematokrit	Diferencijalni broj leukocita
Koncentracija hemoglobina	Broj trombocita
Prosječna masa hemoglobina	Vrijeme zgrušavanja (odabrati jedno):
Prosječni volumen eritrocita	— Protrombinsko vrijeme
Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima	— Vrijeme zgrušavanja
Retikulociti	— Parcijalno tromboplastinsko vrijeme
Klinička kemija	
Glukoza (*)	Alanin aminotransferaza
Ukupni kolesterol	Aspartat aminotransferaza
Trigliceridi	Alkalna fosfataza
Dušična urea u krvi	Kalij
Ukupni bilirubin	Natrij
Kreatinin	Kalcij
Ukupni proteini	Fosfor
Albumini	Kloridi
Globulini	
Analiza urina (opcija)	
Izgled (boja i zamućenost)	Ukupni proteini
Volumen	Glukoza
Specifična težina ili osmolalnost	Krv/krvne stanice
pH	

(*) Budući da dulji post može izazvati pristranost u mjerenju glukoze za tretirane i kontrolne životinje, voditelj istraživanja treba odrediti trebaju li životinje postiti. Ako se primjenjuje razdoblje posta, ono treba biti primjereno korištenim vrstama; za štakore to može biti 16 h (post preko noći). Određivanje glukoze u razdoblju posta može se provesti nakon prekonoćnog posta u zadnjem tjednu izlaganja ili nakon prekonoćnog posta prije obdukcije (u posljednjem slučaju zajedno sa svim ostalim kliničko-patološkim parametrima).

▼M4

39. Ako postoji dokaz da je donji respiratorni trakt (tj. alveole) primarno mjesto taloženja i retencije, bronhoalveolarno ispiranje (BAL) može biti tehnika izbora za kvantitativnu analizu hipotetski utemeljenih parametara učinka doze fokusiranih na alveolitis, upalu pluća i fosfolipidozu. To omogućuje prikladno i temeljito istraživanje promjena u ozljedama na alveolama povezanih s reakcijama na dozu i protok vremena. Tekućina za BAL mora se analizirati radi ukupnog i diferencijalnog broja leukocita, ukupnog broja proteina i laktat dehidrogenaze. Drugi parametri koji se mogu uzeti u obzir jesu parametri indikativni za lizosomalne bolesti, fosfolipidozu te iritacijske ili alergijske upale koje mogu uključivati određivanje proupalnih citokineza/kemokineza. Mjerenja BAL obično upotpunjuju rezultate histopatoloških pretraga, ali ih ne mogu zamijeniti. Upute za provođenje ispiranja pluća nalaze se u GD 39 (2).

OFTALMOLOŠKI PREGLED

40. Primjenom oftalmoskopa ili ekvivalentnog uređaja treba obaviti pregled fundusa, refrakcijskih medija, šarenice i konjunktive za sve životinje prije primjene ispitivane kemikalije te za sve na skupine izložene visokoj koncentraciji i kontrolne skupine na kraju. Ako se otkriju promjene u očima, treba pregledati sve životinje u ostalim skupinama uključujući satelitsku (reverzibilnu) skupinu.

MAKROSKOPSKA PATOLOGIJA I MASA ORGANA

41. Sve pokusne životinje, uključujući i one koje su tijekom ispitivanja uginule ili su uklonjene iz studije radi svoje dobrobiti, treba podvrgnuti kompletnim pretragama (ako je izvedivo) i makroskopskoj analizi. Treba zabilježiti vrijeme između kraja posljednjeg izlaganja svake životinje i njezina usmrćivanja. Ako se obdukcija ne može provesti neposredno nakon otkrića uginule životinje, životinju treba ohladiti (ne zamrznuti) na dovoljno niskim temperaturama kako bi se razgradnja svela na minimum. Obdukciju treba provesti što je moguće prije, obično u roku od jednog ili dva dana. Za svaku životinju treba zabilježiti sve makroskopske patološke promjene uz poseban naglasak na promjenama u respiratornom traktu.

42. U tablici 2. nalazi se popis organa i tkiva koje tijekom makroskopske analize treba sačuvati u odgovarajućem mediju radi histopatoloških pretraga. Čuvanje [točno određenih] organa i tkiva te drugih organa i tkiva prepušteno je voditelju istraživanja. **Masno otisnute** organe treba obrezati i izvagati što je moguće prije nakon sekcije kako bi se izbjeglo njihovo sušenje. Štitnjaču i epididimise treba izvagati samo ako je potrebno jer obrezivanje artefakata može spriječiti histopatološku procjenu. Tkiva i organe treba fiksirati u puferiranom 10 % formalinu ili drugom prikladnom fiksativu odmah nakon provedene obdukcije, i to, dakle, ne kraće od 24 - 48 sati prije obrezivanja ovisno o primijenjenom fiksativu.

▼M4

Tablica 2.

Organi i tkiva sačuvani tijekom makroskopske analize

Nadbubrežne žlijezde	Jednjak
Aorta	[Olfaktorni bulbus]
Koštana srž (i/ili svježi aspirat)	**Jajnici**
Mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	Gušterača
Cekum	Paraštitna žlijezda
Debelo crijevo	Periferni živac (bedreni ili tibijalni, po mogućnosti blizu mišića)
Dvanaesnik	Hipofiza
[**Epididimisi**]	Prostata
[Oči (mrežnica, očni živac) i očni kapci]	Rektum
Bedrena kost i zglob koljena	Žlijezde slinovnice
Žučni mjehur (ako postoji)	Sjemenski mjehurići
[Harderove žlijezde]	Koža
Srce	Kralježnica (vratna, srednja prsna i slabinska)
Ileum	**Slezena**
Jejunum	Prsna kost
Bubrezi	Želudac
[Suzne žlijezde (ekstraorbitalne)]	Zubi
Grkljan (3 razine uključujući bazu epiglotisa)	**Testisi**
Jetra	**Timus**
Pluća (svi režnjevi na jednoj razini, uključujući glavni bronh)	**Štitne žlijezde**
Limfni čvorovi iz hilarne regije pluća, posebno za slabo topljive ispitivane kemikalije u česticama. Za dublje pretrage i/ili istraživanja s imunološkim fokusom u obzir se mogu uzeti dodatni limfni čvorovi, npr. iz medijastinalne, cervikalne/submandibularne i/ili aurikularne regije.	[Jezik]
Limfni čvorovi (udaljeni od ulaza)	Dušnik (najmanje 2 razine uključujući 1 longitudinalnu sekciju kroz greben i 1 transverzalnu sekciju)
Mliječne žlijezde (ženske)	[Mokraćovod]
Mišić (bedro)	[Mokraćna cijev]
Nazofaringealna tkiva (najmanje 4 razine: 1 razina za uključivanje nazofaringealnog kanala i nazalno limfatičko tkivo (NALT))	Mokraćni mjehur
	Maternica
	Organi mete
	Sve makroskopske lezije i mase

▼M4

43. Pluća treba ukloniti netaknuta, izvagati te polako nalijevati prikladnim fiksativom pod tlakom od 20 - 30 cm vode kako bi se osiguralo održanje strukture pluća (5). Sekcije treba prikupiti za sve režnjeve jedne razine, uključujući glavni bronh, ali ako je provedeno ispiranje pluća, neisprani režanj treba secirati na tri razine (ne serijske sekcije).

44. Treba ispitati najmanje četiri razine nazofaringealnih tkiva, a jedna od njih mora uključivati nazofaringealni kanal (5) (6) (7) (8) (9) kako bi se omogućilo potpuno ispitivanje ljuskavog, tranzicijskog (necilijarnog respiratornog), respiratornog (cilijarnog respiratornog) i olfaktornog epitela te drenažno limfatično tkivo (NALT; 10, 11). Treba ispitati tri razine grkljana, a jedna od njih mora obuhvaćati bazu epiglotisa (12). Treba ispitati najmanje dvije razine dušnika uključujući jednu longitudinalnu sekciju kroz greben mjesta razdvajanja ekstrapulmonalnog bronha te jednu transverzalnu sekciju.

HISTOPATOLOGIJA

45. Treba provesti histopatološku procjenu svih organa i tkiva navedenih u tablici 2. za kontrolnu skupinu i skupinu izloženu visokoj koncentraciji te za sve životinje koje uginu ili su usmrćene tijekom studije. Posebnu pozornost treba posvetiti respiratornom traktu, organima metama te makroskopskim lezijama. Organe i tkiva s lezijama u skupini izloženoj visokoj koncentraciji treba ispitati u svim skupinama. Voditelj istraživanja može odlučiti provesti histopatološke pretrage za dodatne skupine kako bi dokazao jasnu reakciju na koncentraciju. Ako se upotrebljava satelitska (reverzibilna) skupina, histopatološku procjenu treba provesti na svim tkivima i organima za koje je u tretiranim skupinama utvrđeno da pokazuju učinke. U slučaju pojavljivanja prekomjernog broja uginulih životinja ili drugih problema u skupini izloženoj visokoj koncentraciji, koje kompromitiraju značenje podataka, histopatološku analizu treba provesti na sljedećoj nižoj koncentraciji. Treba pokušati povezati makroskopska opažanja s mikroskopskim nalazima.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

46. Treba navesti individualne podatke o tjelesnoj masi, potrošnji hrane, kliničkoj patologiji, makroskopskoj patologiji, masi organa te histopatologiji. Podatke prikupljene kliničkim promatranjem treba skupiti u obliku tablice, prikazujući za svaku ispitnu skupinu broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje pokazuju specifične znakove toksičnosti, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme uginuća pojedinih životinja, opis i vremenski tijek te reverzibilnost toksičnih učinaka i nalaze obdukcije. Sve rezultate, kvantitativne i popratne, treba ocijeniti odgovarajućom statističkom metodom. Može se upotrijebiti bilo koja opće prihvaćena statistička metoda, a statističke metode treba odabrati tijekom planiranja studije.

Izvješće o ispitivanju

47. Izvješće o ispitivanju treba, ako je primjereno, sadržavati sljedeće informacije:

Pokusne životinje i njihov uzgoj

— Opis uvjeta u kavezu, uključujući: broj (ili promjenu broja) životinja u svakom kavezu, materijal podloge, temperaturu i relativnu vlažnost zraka u kavezu, razdoblje svjetla i tame, identifikaciju prehrane.

▼M4

— Korištena vrsta/soj i obrazloženje za uporabu druge vrste osim štakora. Mogu se navesti podrijetlo i povijesni podaci ako potječu od životinja izloženih u sličnim uvjetima izlaganja, smještaja i posta.

— Broj, dob i spol životinja.

— Metoda nasumičnog odabira.

— Opis svih kondicioniranja prije ispitivanja, uključujući prehranu, karantenu i liječenje bolesti.

Ispitivana kemikalija

— Fizikalna narav, čistoća te, ako je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući izomerizaciju).

— Identifikacijski podaci i broj registracije Chemical Abstract Services (CAS) ako je poznat.

Nosač

— Obrazloženje za uporabu nosača i obrazloženje za odabir nosača (ako nije voda).

— Povijesni ili odgovarajući podaci koji pokazuju da nosač ne ometa rezultate studije.

Komora za inhalaciju

— Detaljan opis komore za inhalaciju, uključujući volumen i dijagram.

— Podrijetlo i opis opreme korištene za izlaganje životinja te stvaranje atmosfere.

— Oprema za mjerenje temperature, vlažnosti, veličine čestica te stvarne koncentracije.

— Izvor zraka i sustav za klimatizaciju.

— Metode korištene za kalibriranje opreme radi osiguravanja homogene atmosfere za ispitivanje.

— Razlika u tlaku (pozitivna ili negativna).

— Otvori za izlaganje po komori (samo nos); lokacija životinja u sustavu (čitavo tijelo).

— Stabilnost ispitne atmosfere.

— Lokacija senzora temperature i vlažnosti te uzorkovanje ispitne atmosfere u komori.

— Tretiranje dovodnog/ekstrahiranog zraka.

— Količina protoka zraka, otvor za količinu protoka zraka po izlaganju (samo nos) ili dovod životinja po komori (čitavo tijelo).

— Vrijeme za postizanje ravnoteže u komori za inhalaciju (t95).

— Broj promjena u volumenu po satu.

— Uređaji za mjerenje (ako je primjenjivo).

Podaci o izlaganju

— Argumentacija za odabir ciljane koncentracije u glavnoj studiji.

▼M4

— Nazivne koncentracije (ukupna masa ispitivane kemikalije proizvedena u komori za inhalaciju podijeljena volumenom zraka koji je prošao kroz komoru).

— Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije iz zone udisanja životinja; za smjese koje stvaraju heterogene fizikalne oblike (plinove, pare, aerosol) svaka se može analizirati odvojeno.

— Sve koncentracije zraka treba navesti u jedinicama mase (mg/l, mg/m^3 itd.), a ne u jedinicama volumena (ppm, ppb itd.).

— Distribucija veličine čestica, srednji aerodinamički promjer čestica (MMAD) te geometrijska standardna devijacija (σ_g) uključujući metode za njihov izračun. Treba prikazati pojedinačne analize veličine čestica.

Uvjeti ispitivanja

— Detalji o pripremi ispitivane kemikalije, uključujući i detalje o svim postupcima korištenima za smanjenje veličine čestica krutih tvari ili za pripremu otopina ispitivane kemikalije.

— Opis (po mogućnosti uz dijagram) opreme korištene za stvaranje ispitne atmosfere te izlaganje životinja ispitnoj atmosferi.

— Pojedinosti o opremi korištenoj za nadziranje temperature, vlažnosti i protoku zraka u komori (tj. razvoj kalibracijske krivulje).

— Pojedinosti o opremi korištenoj za skupljanje uzoraka za određivanje koncentracije u komori i distribuciju veličine čestica.

— Pojedinosti o korištenoj kemijskoj analitičkoj metodi i potvrdi metode (uključujući učinkovitost rekuperacije ispitivane kemikalije iz medija za uzorkovanje).

— Metoda nasumičnog odabira za svrstavanje životinja u ispitnu i kontrolnu skupinu.

— Pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući tip/izvor hrane, izvor vode).

— Argumentacija za odabir ispitnih koncentracija.

Rezultati

— Tablični prikaz temperature, vlažnosti zraka i protoka zraka u komori.

— Tablični prikaz podataka o nazivnoj i stvarnoj koncentraciji u komori.

— Tablični prikaz podataka u veličini čestica, uključujući podatke o skupljenim analitičkim uzorcima, distribuciju veličina čestica te izračune MMAD i σ_g.

— Tablični prikaz podataka o reakciji i razini koncentracije za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti uključujući smrtnost, narav, stupanj, vrijeme nastupanja i trajanja učinaka).

▼M4

— Tablični prikaz pojedinačne mase životinja.

— Tablični prikaz unosa hrane.

— Tablični prikaz kliničko-patoloških podataka.

— Nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju ako su dostupni.

Rasprava i tumačenje rezultata

— Poseban naglasak treba staviti na opis metoda korištenih za ispunjavanje kriterija ove ispitne metode, npr. graničnu koncentraciju ili veličinu čestica.

— Treba raspravljati o sposobnosti udisanja čestica u svjetlu općih nalaza, posebno ako se nisu mogli ispuniti kriteriji za veličinu čestica.

— U opću ocjenu studije treba uključiti dosljednost metoda korištenih za određivanje nazivnih i stvarnih koncentracija te odnos stvarne koncentracije prema nazivnoj.

— Treba se pozabaviti uzrokom smrti i prevladavajućim načinom djelovanja (sistemski u odnosu na lokalni).

— U slučaju humanog usmrćivanja životinja koje su patile ili pokazivale znakove velikog i trajnog stresa treba pružiti objašnjenje na temelju kriterija iz Smjernice za humano usmrćivanje OECD-a (3).

— Treba identificirati organ/e metu/e.

— Treba odrediti NOAEL i LOAEL.

LITERATURA

1. OECD (1981.). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Pariz.

2. OECD (2009.). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

4. Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13. Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, kojom se izmjenjuju i dopunjuju i ukidaju Direktiva 67/548/EEZ i 1999/45/EZ te izmjenjuje i dopunjuje Uredba (EZ) br. 1907/2006, SL L 353, 31.12.2008., str. 1.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M4

B.30. STUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 452 (2009.). Originalna Smjernica za ispitivanje 452 usvojena je 1981. Smatralo se da je nužno razviti ovu revidiranu ispitnu metodu B.30 kako bi se odrazio skorašnji razvoj u području dobrobiti životinja i regulatornih zahtjeva (1) (2) (3) (4). Ažuriranje ove ispitne metode B.30 provedeno je paralelno s revizijom Poglavlja B.32 ovog Priloga, Test karcinogenosti te Poglavlja B.33 ovog Priloga, Kombinirani test kronične toksičnosti/karcinogenosti, s ciljem dobivanja dodatnih informacija od korištenih životinja i skupljanja daljnjih pojedinosti o odabiru doza. Ova ispitna metoda namijenjena je primjeni u ispitivanju širokog spektra kemikalija, uključujući pesticide i industrijske kemikalije.

2. Većina studija kronične toksičnosti provodi se na vrstama glodavaca, stoga i ovu ispitnu metodu treba primjenjivati prvenstveno u studijama koje se provode na tim vrstama. Ako se takve studije traže na vrstama ne-glodavaca, također se mogu primijeniti načela i postupci izloženi u ovoj ispitnoj metodi, zajedno s onima izloženima u Poglavlju B.27 ovog Priloga, 90-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na ne-glodavcima uz primjenu ponavljanih doza (5), uz odgovarajuće izmjene, kao što je izneseno u Smjernici za OECD-a br. 116 u vezi s planiranjem i provođenjem studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (6).

3. Tri glavna načina primjene upotrijebljena u studijama toksičnosti jesu oralni, dermalni i inhalacijski. Odabir načina primjene ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije te o pretežnom načinu izlaganja ljudi. Dodatne informacije o odabiru načina izlaganja navedene su u Smjernici OECD-a br. 116 (6).

4. Ova ispitna metoda usmjerena je na izlaganje oralnim putem, što je najčešće korišteni način u studijama kronične toksičnosti. Dok dugotrajne studije kronične toksičnosti, koje uključuju izlaganje preko kože ili inhalacijom, mogu također biti potrebne i/ili se mogu tražiti pod određenim regulatornim režimima radi određivanja rizika za ljude, oba načina izlaganja uključuju znatnu tehničku složenost. Takve studije treba isplanirati za svaki slučaj posebno iako ovdje izložena ispitna metoda za utvrđivanje i procjenu kronične toksičnosti oralnom primjenom može činiti temelj protokola za studije primjene inhalacijom i/ili dermalnim putem, s obzirom na preporuke za razdoblja tretiranja, kliničke i patološke parametre itd. Dostupna je Smjernica OECD-a za primjenu ispitivanih kemikalija inhalacijom (6) (7) i dermalnim putem (6). Poglavlje B.8 ovog Priloga (8) i Poglavlje B.29 ovog Priloga (9), zajedno sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje akutne inhalacije (7), trebaju se pomno proučiti pri planiranju dugotrajnijih studija koje uključuju izlaganje inhalacijom. Poglavlje B.9 ovog Priloga (10) treba uzeti kao pomoć pri ispitivanju provedenom dermalnim putem.

▼M4

5. Studija kronične toksičnosti pruža informacije o mogućim rizicima za zdravlje koji će se vjerojatno pojaviti zbog ponovljenog izlaganja kroz dulje životno razdoblje korištenih vrsta. Ta će studija pružiti informacije o toksičnim učincima ispitivane kemikalije, ukazati na organe mete te mogućnost akumulacije. Također može pružiti procjenu neopaženih štetnih učinaka koja se može upotrijebiti za određivanje sigurnosnih kriterija za izlaganje ljudi. Također je naglašena potreba za pažljivim kliničkim opažanjima životinja radi dobivanja što je moguće više informacija.

6. Ciljevi studije obuhvaćeni ovom ispitnom metodom uključuju:

— identifikaciju kronične toksičnosti ispitivane kemikalije,

— identifikaciju organa meta,

— karakterizaciju odnosa doze i reakcije,

— identifikaciju razine neopaženih štetnih učinaka (NOAEL) ili polazne točke za određivanje referentne doze za usporedbu (benchmark dose, BMD),

— predviđanje učinaka kronične toksičnosti na razinama ljudskog izlaganja,

— pružanje podataka za ispitivanje pretpostavki u svezi s načinom djelovanja (6).

UVODNA RAZMATRANJA

7. U određivanju i procjeni toksikoloških svojstava ispitivane kemikalije ispitni laboratorij prije provođenja studije mora u obzir uzeti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji kako bi se planiranje studije usmjerilo na učinkovitije ispitivanje potencijala kronične toksičnosti te kako bi se na minimum svela primjena životinja. Informacije koje će pomoći u planiranju studije obuhvaćaju identitet, kemijsku strukturu i fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije, sve informacije o načinu djelovanja, rezultate svih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo*, očekivanu/e primjenu/e i potencijal za ljudsko izlaganje, dostupne podatke (Q)SAR i toksikološke podatke o kemikalijama srodne strukture, dostupne toksikokinetičke podatke (kinetika jedne doze i ponovljene doze ako je dostupno) te podatke dobivene u drugim studijama s ponovljenim izlaganjem. Određivanje kronične toksičnosti treba provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz 28-dnevnog i/ili 90-dnevnog ispitivanja toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza. Pristup s fazama u ispitivanju kronične toksičnosti treba smatrati dijelom ukupnog utvrđivanja potencijalno štetnih učinaka dotične ispitivane kemikalije po zdravlje (11) (12) (13) (14).

8. Prije početka studije treba odrediti najprikladnije statističke metode za analizu rezultata s obzirom na plan i ciljeve pokusa. Pitanja koja valja uzeti u obzir jesu treba li statistika uključivati prilagodbu za preživljavanje i analizu u slučaju prijevremenog kraja jedne ili više skupina. Smjernice o odgovarajućim statističkim analizama i ključnim referencama na međunarodno prihvaćene statističke metode nalaze se u Smjernici br. 116. (6) te također u Smjernici br. 35. za analizu i ocjenu studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (15).

▼M4

9. Pri provođenju studije kronične toksičnosti uvijek treba slijediti načela i razloge izložene u OECD-ovoj Smjernici br. 19. o prepoznavanju, utvrđivanju i primjeni kliničkih znakova kao humanih krajnjih učinaka za pokusne životinje korištene u procjeni sigurnosti (16), posebno u njezinom stavku 62. U tom stavku stoji da „u studijama uz primjenu ponovljenog doziranja, kada životinje pokazuju progresivne kliničke znakove koji izazivaju daljnje pogoršanje stanja, treba donijeti upućenu odluku o tome treba li humano usmrtiti životinje ili ne. Odluka treba uključivati razloge s obzirom na vrijednost informacija dobivenih iz trajnog održavanja te životinje u studiji s obzirom na njezino opće stanje. Ako se odluči zadržati životinju u ispitivanju, učestalost opažanja treba povećati u skladu s potrebama. Također se može privremeno prekinuti s doziranjem ako će to olakšati patnju ili stres ili smanjiti ispitnu dozu bez štetnih utjecaja na svrhu ispitivanja.”

10. Detaljne upute za načela odabira doza za studije kronične toksičnosti i karcinogenosti te rasprava o njima mogu se pronaći u Smjernici br. 116. (6), kao i u dvije publikacije instituta International Life Sciences Institute (17) (18). Osnovna strategija odabira doza ovisi o primarnom cilju ili primarnim ciljevima studije (stavak 6.). Pri odabiru odgovarajućih razina doza treba postići ravnotežu između procjene opasnosti s jedne strane i karakterizacije reakcija na nisku dozu te njihovo značenje s druge strane. To je posebno relevantno u situaciji u kojoj treba provesti kombiniranu studiju kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga) (stavak 11.).

11. Treba navesti razloge za provođenje kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga), a ne odvojeno provođenje studije kronične toksičnosti (ova ispitna metoda B.30) i karcinogenosti (Poglavlje B.32 ovog Priloga). Kombinirano ispitivanje pruža veću učinkovitost što se tiče vremena i troškova u usporedbi s provođenjem dviju zasebnih studija, bez kompromitiranja kvalitete podataka u kroničnoj fazi niti u kancerogenoj fazi. Pri provođenju kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga) treba pažljivo razmisliti o načelima odabira doza (stavci 9. i 20. - 25.) te se također priznaje da pod određenim regulatornim okvirima mogu biti nužne odvojene studije.

12. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog poglavlja i u Smjernici br. 116. (6).

NAČELO ISPITIVANJA

13. Ispitivana kemikalija daje se svakodnevno u postupnim dozama raznim skupinama pokusnih životinja, obično u razdoblju od 12 mjeseci iako se mogu odabrati dulja ili kraća trajanja ovisno o regulatornim zahtjevima (vidjeti stavak 33.). Odabire se dovoljno dugo vrijeme koje bi omogućilo manifestaciju učinaka kumulativne toksičnosti bez miješanja s učincima gerijatrijskih promjena. Treba obrazložiti odstupanja od trajanja izlaganja od 12 mjeseci, posebno u slučajevima kraćeg trajanja. Ispitivana kemikalija obično se primjenjuje oralnim putem iako se može primijeniti i ispitivanje inhalacijom ili dermalnim putem. Planiranje studije također može uključivati jedno ili više usmrćivanja u međuvremenu, npr. s tri i šest mjeseci, i mogu se uključiti dodatne skupine životinja kako bi se to kompenziralo (vidjeti stavak 19.). Tijekom razdoblja primjene životinje se pomno promatraju radi otkrivanja znakova toksičnosti. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

▼M4

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

14. Ova ispitna metoda prvenstveno obuhvaća određivanje i ocjenu kronične toksičnosti u glodavaca (vidjeti stavak 2.) iako se priznaje da pod određenim regulatornim režimima mogu biti potrebne slične studije na ne-glodavcima. Treba obrazložiti odabir vrsta. Planiranje i provođenje studija kronične toksičnosti na vrstama ne-glodavaca, ako je potrebno, treba temeljiti na načelima izloženima u ovoj ispitnoj metodi zajedno s načelima iz Poglavlja B.27 ovog Priloga, 90-dnevna studija oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza na ne-glodavcima (5). Dodatne informacije o odabiru vrste i soja navedene su u Smjernici br. 116. (6).

15. Prednost se u ovoj ispitnoj metodi daje štakorima kao vrsti glodavaca iako se mogu upotrijebiti i druge vrste glodavaca, npr. miševi. Štakori i miševi preferirani su pokusni modeli zbog relativno kratkog životnog vijeka, raširene primjene u farmakološkim i toksikološkim studijama, osjetljivosti na izazivanje tumora te dostupnosti dovoljno karakteriziranih sojeva. Kao posljedica tih svojstava, dostupno je mnogo informacija o njihovoj fiziologiji i patologiji. Treba upotrijebiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji su uobičajeni u laboratorijskoj praksi. Studiju kronične toksičnosti treba provesti na životinjama istog soja i podrijetla kao i životinje korištene u preliminarnoj/im studiji/-ama toksičnosti kraćeg trajanja. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne.

Uvjeti smještaja i hranjenja

16. Životinje moraju biti smještene pojedinačno ili u kavezima u malim skupinama istog spola; pojedinačni smještaj treba uzeti u obzir samo ako je znanstveno opravdan (19) (20) (21). Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Temperatura u prostoriji s pokusnim životinjama morala bi iznositi 22 °C (± 3 °C). Premda bi relativna vlažnost zraka trebala iznositi najmanje 30 % te po mogućnosti ne premašivati 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50 - 60 %. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može primjenjivati konvencionalna laboratorijska prehrana uz neograničene količine pitke vode. Prehrana mora ispunjavati sve nutritivne potrebe ispitivanih vrsta, a udio tvari koje kontaminiraju hranu - uključujući ostatke pesticida, postojane organske zagađivače, fitoestrogene, teške metale i mikotoksine, ali ne ograničeno na njih - koje mogu utjecati na rezultat ispitivanja treba biti što je moguće manji. Analitičke informacije o razinama tvari koje kontaminiraju hranjive tvari i prehranu treba izrađivati periodično, barem na početku studije te u slučaju promjene u primijenjenoj seriji, i treba ih uključiti u završno izvješće. Također treba pružiti analitičke informacije o vodi za piće korištenoj u istraživanju. Na odabir prehrane može utjecati potreba za osiguranjem prikladnih dodataka ispitivane kemikalije i ispunjavanjem nutritivnih potreba životinja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje kroz hranu.

Priprema životinja

17. Treba upotrijebiti zdrave životinje koje su se aklimatizirale na laboratorijske uvjete najmanje sedam dana i koje nisu izlagane prethodnim pokusnim postupcima. U slučaju glodavaca doziranje životinja treba početi što je moguće prije nakon prestanka odbijanja od sise i aklimatizacije te po mogućnosti prije nego što životinje navrše osam tjedana. Ispitne životinje treba karakterizirati što se tiče vrste, soja, podrijetla, spola, mase i starosti. Na početku studije odstupanje u masi za svaki spol korištenih životinja

▼M4

mora biti minimalno i ne smije biti veće od ± 20 % prosječne mase svih životinja u studiji, posebno za svaki spol. Životinje treba nasumično odrediti za kontrolne i ispitne skupine. Nakon nasumičnog odabira ne smije biti značajne razlike u prosječnoj tjelesnoj masi između skupina svakog spola. U slučaju statistički značajnih razlika treba ponoviti fazu nasumičnog odabiranja ako je moguće. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj i treba je trajno označiti tim brojem tetovažom, ugradnjom mikročipa ili drugom odgovarajućom metodom.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

18. Treba upotrijebiti oba spola. Treba upotrijebiti dovoljan broj životinja kako bi na kraju studije u svakoj skupini bilo dovoljno životinja za temeljitu biološku i statističku ocjenu. Za glodavce obično treba upotrijebiti najmanje 20 životinja svakog spola po skupini za svaku visinu doze dok se za ne-glodavce preporučuje minimalno četiri životinje svakog spola po skupini. U studijama koje uključuju miševe u svakoj skupini za doziranje mogu biti potrebne dodatne životinje kako bi se provele sve tražene hematološke pretrage.

Opskrba za usmrćivanje u međuvremenu, satelitske skupine i indikatorske životinje

19. Studija može uključivati opskrbu za usmrćivanje u međuvremenu (najmanje deset životinja po spolu i skupini), npr. s tri i šest mjeseci, kako bi se pribavile informacije o napredovanju toksikoloških promjena i mehanističke informacije ako je to znanstveno opravdano. Ako su takve informacije već dostupne iz prethodnih studija toksičnosti ispitivane kemikalije uz primjenu ponavljanih doza, usmrćivanje u međuvremenu nije znanstveno opravdano. Također se mogu uključiti i satelitske skupine radi nadzora reverzibilnosti svih toksikoloških promjena izazvanih ispitivanom kemikalijom koja se ispituje; one su obično ograničene na najvišu visinu doze u studiji plus kontrola. Ako je potrebno, tijekom studije također se može uključiti i dodatna skupina indikatorskih životinja (tipično pet životinja po spolu) radi praćenja stanja bolesti (22). Ako se planiraju usmrćivanja u međuvremenu ili satelitske ili indikatorske skupine, broj životinja uključenih u planiranje studije treba povećati za broj životinja određenih za usmrćivanje prije završetka studije. Te životinje moraju normalno proći sva opažanja uključujući tjelesnu masu, unos hrane/vode, hematološka i biokemijska mjerenja te patološke pretrage kao i životinje u fazi kronične toksičnosti glavne studije iako se također može osigurati (u skupinama za usmrćivanje u međuvremenu) da se mjerenja ograniče na specifična, ključna mjerenja poput neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti.

Skupine za doziranje i doziranje

20. Smjernice u vezi sa svim aspektima odabira doza i razmak među visinama doza nalaze se u Smjernici br. 116. (6). Treba upotrijebiti najmanje tri visine doza i paralelnu kontrolu, osim ako je proveden granični test (vidjeti stavak 27.). Visine doza općenito se temelje na rezultatima kraćih studija uz primjenu ponavljanih doza ili studija za određivanje raspona i u obzir moraju uzeti sve toksikološke i toksikokinetičke podatke dostupne o ispitivanoj kemikaliji ili srodnim kemikalijama.

▼M4

21. Osim ako nije ograničeno fizikalno-kemijskom naravi ili biološkim učincima ispitivane kemikalije, obično treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se identificirali organi mete i toksični učinci uz izbjegavanje patnje, ozbiljne toksičnosti, boležljivosti ili smrti. Uzimajući u obzir čimbenike izložene u stavku 22. u nastavku, treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se izveli dokazi o toksičnosti, kao što je, primjerice, dokazano padom povećanja tjelesne mase (otprilike 10 %).

22. No, ovisno o ciljevima studije (vidjeti stavak 6.), može se odabrati najviša visina doze manja od doze koja pruža dokaze o toksičnosti npr. ako doza izaziva štetan, zabrinjavajuć učinak koji unatoč tomu utječe na životni vijek ili tjelesnu masu. Najviša doza ne smije biti veća od 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno (granična doza, vidjeti stavak 27.).

23. Visine doza i razmaci između visina doza mogu se odabrati kako bi se odredio ishod doza-reakcija i NOAEL ili drugi namjeravani ishod studije, npr. BMD (vidjeti stavak 25.) na najnižoj visini doze. Čimbenici koje treba uzeti u obzir pri dodjeljivanju nižih doza uključuju očekivani nagib krivulje doze i reakcije, doze na kojima se mogu dogoditi važne promjene u metabolizmu ili načinu toksičnog djelovanja, gdje se očekuje prag ili gdje se očekuje polazna točka za ekstrapolaciju za niske doze.

24. Odabrani razmak između visina doza ovisit će o svojstvima ispitivane kemikalije i ova ispitna metoda ne može ga propisati, ali dva do četiri intervala smanjenja često pružaju dobru uspješnost ispitivanja kada se koriste za određivanje silaznih visina doza, a često se daje prednost dodavanju četvrte ispitne skupine nego primjeni vrlo velikih intervala (npr. više od faktora između 6 - 10) među dozama. Općenito treba izbjegavati primjenu faktora većih od deset i treba ih opravdati ako se primjenjuju.

25. Kao što je izloženo u nastavku Smjernice br. 116. (6), točke koje treba uzeti u obzir pri odabiru doze uključuju:

— Poznate nelinearnosti ili točke savijanja u odnosu doze i reakcije ili one na koje se sumnja,

— Toksikokinetiku i raspone doza u kojima se događaju ili ne događaju metabolička indukcija, zasićenje ili nelinearnost između vanjskih i unutarnjih doza,

— Prethodne lezije, markeri učinka ili indikatori operacije ključnih temeljnih bioloških procesa,

— Ključni aspekti ili načini djelovanja (ili oni na koje se sumnja), poput doza na kojima počinje rasti citotoksičnost, razina hormona se poremeti, homeostatski mehanizmi uništavaju itd.,

— Regije krivulje doze i reakcije gdje je potrebna posebno jaka procjena, npr. u rasponu očekivanog BMD-a ili praga na koji se sumnja,

— Uzimanje u obzir očekivanih razina ljudskog izlaganja.

▼M4

26. Kontrolna skupina mora biti netretirana skupina ili skupina za kontrolu nosača ako se u primjeni ispitivane kemikalije primjenjuje nosač. Osim radi tretiranja ispitivanom kemikalijom, životinje u kontrolnoj skupini treba tretirati na jednak način kao i životinje u ispitnim skupinama. Ako se primjenjuje nosač, kontrolna skupina mora primiti nosač u najvećoj količini primijenjenoj u skupinama koje primaju doze. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu i ako izaziva značajno smanjeno unosa hrane zbog smanjene tečnosti hrane, može biti korisna dodatna kontrolna skupina koja se hrani u paru kako bi poslužila za primjereniju kontrolu.

27. Ako se na temelju informacija iz preliminarnih studija može očekivati da ispitivanje na jednoj visini doze, ekvivalentnoj najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase po danu, uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne može izazvati štetne učinke te ako se na temelju podataka od kemikalija srodne strukture ne očekuje toksičnost, ne mora biti nužna potpuna studija uz primjenu tri visine doza. Granica od 1 000 mg/kg tjelesne mase po danu vrijedi osim ako izlaganje ljudi ne pokaže potrebu za primjenom više visine doze.

Priprema doza i primjena ispitivane kemikalije

28. Ispitivana kemikalija obično se daje oralno, kroz hranu ili vodu za piće ili pak sondom. Dodatne informacije o načinima i metodama davanja navedene su u Smjernici br. 116. (6). Način i metoda primjene ovisi o svrsi studije, fizikalnim/kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, njezinoj bioraspoloživosti te pretežnom načinu i metodi izlaganja ljudi. Treba predočiti argumentaciju za odabrani način i metodu primjene. Radi dobrobiti životinja sondu valja upotrijebiti samo za sredstva za koje taj način i metoda primjene opravdano predstavljaju potencijalno izlaganje ljudi (npr. lijekovi). Kemikalije iz hrane ili okoliša, uključujući pesticide, obično se primjenjuju kroz hranu ili vodu za piće. No, u nekim je situacijama, npr. pri radnom izlaganju, prikladnije izlaganje na druge načine.

29. Po potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. U obzir treba uzeti sljedeća svojstva nosača i drugih aditiva po potrebi: učinke na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili retenciju ispitivane kemikalije; učinke na kemijska svojstva ispitivane kemikalije koja se mogu promijeniti u toksična svojstva te učinke na unos hrane ili vode ili nutritivnog statusa životinja. Preporučuje se da se, kada je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/suspenzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače različite od vode moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Moraju biti dostupne informacije o stabilnosti ispitivane kemikalije i homogenosti otopina za doziranje ili prehranu (odgovarajući) pod uvjetima primjene (npr. prehrana).

30. Kod kemikalija koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. U dugotrajnim studijama toksičnosti uz primjenu davanja kroz hranu koncentracija ispitivane kemikalije u hrani obično ne smije premašiti gornju granicu od 5 % ukupne hrane kako bi se izbjegla nutritivna neravnoteža. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu, može se upotrijebiti konstantna koncentracija u hrani (hrana mg/kg ili ppm) ili konstantna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje (mg/kg tjelesne mase) izračunata na tjednoj bazi. Treba specificirati korištenu alternativu.

▼M4

31. U slučaju oralne primjene životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija (sedam dana svakog tjedna), obično u razdoblju od 12 mjeseci (vidjeti i stavak 33.) iako, ovisno o regulatornim zahtjevima, može biti potrebno i dulje trajanje. Svaki drukčiji režim primjene, npr. pet dana tjedno, treba obrazložiti. U slučaju dermalne primjene životinje se ispitivanom kemikalijom obično tretiraju najmanje šest sati dnevno, sedam dana tjedno, kao što je navedeno u Poglavlju B.9 ovog Priloga (10), u razdoblju od 12 mjeseci. Izlaganje inhalacijom provodi se šest sati dnevno, sedam dana tjedno, ali može se primijeniti i izlaganje pet dana ako je opravdano. Razdoblje izlaganja obično traje 12 mjeseci. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanje izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Treba pružiti argumentaciju za primjenu izlaganja kraćeg od šest sati dnevno. Vidjeti također i Poglavlje B.8 ovog Priloga (8).

32. Ako se ispitivana kemikalija životinjama daje sondom, to treba provesti želučanom sondom ili prikladnom intubacijskom kanilom u slično vrijeme svakog dana. Obično se jedanput dnevno daje jedna doza, primjerice u slučajevima kada je kemikalija lokalni iritans, no moguće je zadržati dnevnu količinu doze na način da je se podijeli (dvaput dnevno). Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Količinu treba održavati toliko niskom da bude praktična, a obično ne bi trebala biti veća od 1 ml/100 g tjelesne mase za glodavce (22). Varijabilnost u ispitnoj količini treba svesti na minimum prilagodbom koncentracije kako bi se osigurala konstantna količina na svim visinama doze. Iznimku predstavljaju potencijalno nagrizajuće ili nadražujuće kemikalije te ih treba razrijediti kako bi se izbjegli ozbiljni lokalni učinci. Treba izbjegavati ispitivanje na koncentracijama koje su vjerojatno nagrizajuće ili nadražujuće za gastrointestinalni trakt.

Trajanje studije

33. Dok je ova ispitna metoda primarno planirana kao studija kronične toksičnosti u trajanju od 12 mjeseci, planiranje studije omogućuje i kraća (npr. 6 ili 9 mjeseci) ili dulja (npr. 18 ili 24 mjeseci) trajanja, ovisno o zahtjevima posebnih regulatornih režima ili radi specifičnih mehanističkih svrha. Treba obrazložiti odstupanja od trajanja izlaganja od 12 mjeseci, posebno u slučajevima kraćeg trajanja. Satelitske skupine uključene radi nadzora reverzibilnosti bilo kakvih toksikoloških promjena izazvanih ispitivanom kemikalijom tijekom studije treba održavati bez doziranja u razdoblju ne kraćem od četiri tjedna te ne dulje od trećine ukupnog trajanja studije nakon prestanka izlaganja. Ostale smjernice, uključujući razmatranja o preživljavanju u istraživanju, nalaze se u Smjernici br. 116. (6).

OPAŽANJA

34. Sve životinje treba pregledati radi bolježljivosti ili ugibanja, obično na početku i kraju svakog dana, uključujući vikend i praznike. Opća klinička opažanja valja provoditi najmanje jedanput dnevno, po mogućnosti u isto vrijeme/ista vremena svakog dana te uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja u slučaju primjene sondom.

▼M4

35. Detaljna klinička opažanja valja provoditi na svim životinjama najmanje jedanput prije prvog izlaganja (kako bi se omogućila usporedba za svaku jedinku), na kraju prvog tjedna studije te zatim mjesečno. Protokol za opažanja treba organizirati tako da se na minimum svedu varijacije između pojedinih promatrača i ovisno o ispitnoj skupini. Ta opažanja treba obaviti izvan domicilnog kaveza, po mogućnosti u standardnoj areni te svaki put u slično vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti sustav vrednovanja jasno definiran od strane laboratorija koji obavlja ispitivanje. Treba se potruditi osigurati da su varijacije u uvjetima opažanja minimalne. Zabilježeni znakovi moraju obuhvaćati promjene na koži, krznu, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka i izlučevina te autonomne aktivnosti (npr. lakrimaciju, piloerekciju, veličinu zjenica te nepravilnosti u disanju), ali ne biti ograničeni na njih. Također treba zabilježiti promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug) ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (24).

36. Oftalmološke preglede uz primjenu oftalmoskopa ili druge odgovarajuće opreme treba obaviti na svim životinjama prije prve primjene ispitivane kemikalije. Na kraju studije te preglede treba po mogućnosti obaviti na svim životinjama, ali barem u skupini s visokom dozom i kontrolnoj skupini. Ako se na očima opaze promjene povezane s tretiranjem, treba pregledati sve životinje. Ako strukturna analiza ili druge informacije upućuju na okularnu toksičnost, treba povećati učestalost oftalmoloških pregleda.

37. Za kemikalije za koje prethodne 28-dnevne i/ili 90-dnevne studije toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza ukazuju na potencijalno uzrokovanje neurotoksičnih učinaka, senzoričke reaktivnosti na stimulanse različitih tipova (24) (npr. zvučne, vizualne i proprioceptivne stimulanse) (25), (26), (27), prije početka studije te u razdobljima od 3 mjeseca nakon početka studije pa do 12 mjeseci, uključujući i 12. mjesec, te na kraju studije (ako ne traje dulje od 12 mjeseci) mogu se opcijski provesti i određivanje jakosti stiska (28) i određivanje motoričke aktivnosti (29). Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, osim referentnih mogu se primjenjivati i drugi postupci.

38. Za kemikalije, za koje su prethodne 28-dnevne i/ili 90-dnevne studije toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza ukazala na potencijalno izazivanje imunotoksičnih učinaka, na kraju se opcijski mogu provesti daljnja istraživanja tog krajnjeg učinka.

Tjelesna masa, unos hrane/vode i učinkovitost hrane

39. Sve životinje treba izvagati na početku tretiranja, najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Mjerenja unosa i učinkovitosti hrane treba provoditi najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Unos vode treba mjeriti najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno ako se kemikalija primjenjuje preko vode za piće. Mjerenje unosa vode treba također uzeti u obzir i za studije u kojima se mijenja aktivnost pijenja.

▼M4

Hematologija i klinička biokemija

40. U studijama koje uključuju glodavce hematološke pretrage treba obaviti najmanje na deset mužjaka i deset ženki po skupini, nakon 3, 6 i 12 mjeseci te na kraju studije (ako ne traje dulje od 12 mjeseci) uz primjenu istih životinja svaki put. Kod miševa mogu biti potrebne satelitske životinje kako bi se provele sve potrebne hematološke pretrage (vidjeti stavak 18.). Kod studija na neglodavcima uzorci se uzimaju od manjeg broja životinja (npr. četiri životinje po spolu i skupini kod studija na psima), u vrijeme uzorkovanja u međuvremenu te na kraju, kao što je opisano za glodavce. Mjerenja nakon tri mjeseca, bilo u glodavaca ili neglodavaca, ne moraju se provoditi ako na hematološkim parametrima u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivim visinama doze nisu uočeni učinci. Uzorke krvi treba uzimati iz određenog mjesta, primjerice punkcijom srca ili iz retroorbitalnog sinusa, pod anestezijom.

41. Treba ispitati sljedeći popis parametara (30): Ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj eritrocita, broj trombocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit (volumen eritrocita), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječna masa hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), protrombinsko vrijeme te aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. Ostali hematološki parametri poput Heinzovih tjelešaca ili druge atipične morfologije eritrocita ili methemoglobin mogu se mjeriti po potrebi, ovisno o toksičnosti ispitivane kemikalije. Općenito gledano, treba primijeniti fleksibilan pristup ovisno o opaženim i/ili očekivanim učincima davane ispitivane kemikalije. Ako ispitivana kemikalija ne utječe na hematopoetski sustav, može biti indiciran i broj retikulocita i citologija koštane srži iako se te pretrage ne moraju provoditi rutinski.

42. Kliničko-biokemijske pretrage za ispitivanje toksičnih učinaka u tkivima i posebno učinaka na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobivenima od najmanje deset mužjaka i deset ženki po skupini u jednakim vremenskim intervalima kao što je navedeno u hematološkim pretragama uz primjenu istih životinja. Kod miševa mogu biti potrebne satelitske životinje kako bi se provele sve potrebne kliničko-biokemijske pretrage. Kod studija na neglodavcima uzorci se uzimaju od manjeg broja životinja (npr. četiri životinje po spolu i skupini kod studija na psima), u vrijeme uzorkovanja u međuvremenu te na kraju, kao što je opisano za glodavce. Mjerenja nakon 3 mjeseca, bilo u glodavaca ili neglodavaca, ne moraju se provoditi ako na kliničko-biokemijskim parametrima u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivoj visini doze nisu opaženi učinci. Preporučuje se post životinja preko noći (izuzev miševa) prije uzimanja uzoraka krvi. Treba ispitati sljedeći popis parametara (30): glukoza, urea (dušična urea), kreatinin, ukupni proteini, albumini, kalcij, natrij, kalij, ukupani kolesterol, najmanje dvije prikladne pretrage za hepatocelularnu ocjenu (alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, glutamat dehidrogenaza, ukupne žučne kiseline) (31) te najmanje dvije prikladne pretrage za hepatobilijarnu ocjenu (alkalna fosfataza, gama glutamil transferaza, 5′-nukleotidaza, ukupni bilirubin, ukupne žučne kiseline) (31). Ostali kliničko-kemijski parametri poput triglicerida tijekom posta, specifičnih hormona i kolinesteraze mogu se mjeriti ako je potrebno, ovisno o toksičnosti ispitivane kemikalije. Općenito gledano, treba primijeniti fleksibilan pristup ovisno o opaženim i/ili očekivanim učincima davane ispitivane kemikalije.

▼M4

43. Pretrage analize urina treba provesti na najmanje deset mužjaka i deset ženki po skupini na uzorcima skupljenim u jednakim intervalima kao i za hematologiju i kliničku kemiju. Mjerenja nakon 3 mjeseca ne moraju se provoditi ako na analizi urina u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivoj visini doze nisu opaženi učinci. Sljedeći popis parametara bio je uključen u stručne preporuke za kliničko-patološke studije (30): izgled, volumen, osmolalnost ili specifična težina, pH, ukupni proteini i glukoza. Ostale pretrage uključuju ketone, urobilinogen, bilirubin i okultnu krv. Ako je potrebno, mogu se upotrijebiti i drugi parametri radi proširenog istraživanja opaženog učinka/opaženih učinaka.

44. Općenito se smatra da su osnovne hematološke i kliničko-biokemijske varijable potrebne prije tretiranja za studije na psima, ali ih se ne mora odrediti u studijama na glodavcima (30). No, ako su povijesni osnovni podaci (vidjeti stavak 50.) neprikladni, treba se pobrinuti da se ti podaci izrade.

Patologija

Makroskopska analiza

45. Sve životinje korištene u studiji obično se moraju podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj analizi koja obuhvaća pažljivi pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. No, može se odlučiti (kod skupina za usmrćivanje u međuvremenu ili satelitskih skupina) da se mjerenja ograniče na specifične, ključne mjere, poput neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti (vidjeti stavak 19.). Te životinje ne treba podvrgnuti obdukciji i sljedećim postupcima opisanima u stavcima u nastavku. Indikatorske životinje mogu zahtijevati obdukciju u pojedinačnim slučajevima, a odluka je prepuštena voditelju istraživanja.

46. Treba prikupiti masu organa svih životinja, osim onih isključenih zadnjim dijelom stavka 45. Nadbubrežne žlijezde, mozak, epididimise, srce, bubrege, jetru, jajnike, slezenu, štitnjaču (izvaganu poslije fiksacije, s paraštitnim žlijezdama) i maternicu svih životinja (osim onih pronađenih u stanju ugibanja i/ili usmrćenih u međuvremenu) treba obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva po potrebi te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. U studijama na miševima nadbubrežne žlijezde važu se opcijski.

47. Sljedeća tkiva treba čuvati u najprikladnijem fiksacijskom mediju za oba tipa tkiva i namjeravane histopatološke pretrage koja slijedi (32) (tkiva u uglatim zagradama opcijska su):

sve makroskopske lezije	srce	gušterača	želudac (predželudac, žljezdani želudac)
nadbubrežna žlijezda	ileum	paraštitna žlijezda	[zubi]
aorta	jejunum	periferni živac	testis
mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	bubreg	hipofiza	timus
cekum	suzna žlijezda (eksorbitalna)	prostata	štitnjača
cerviks	jetra	rektum	[jezik]

▼M4

koagulacijska žiljezda	pluća	žlijezda slinovnica	dušnik
debelo crijevo	limfni čvorovi (površinski i dubinski)	sjemenski mjehurić	mokraćni mjehur
dvanaesnik	mliječna žlijezda (obvezno za ženke i ako se mogu secirati, od mužjaka)	skeletni mišić	maternica (uključujući cerviks)
epididimis	[gornji respiratorni trakt uključujući nos, turbinate i paranazalne sinuse]	koža	[mokraćovod]
oko (uključujući mrežnicu)	jednjak	kralježnica (na tri razine: vratna, srednja prsna i slabinska)	[mokraćna cijev]
[femur sa zglobom]	[olfaktorni bulbus]	slezena	vagina
žučni mjehur (za vrste drukčije od štakora)	jajnik	[prsna kost],	sekcija koštane srži i/ili aspirat svježe koštane srži
Harderova žlijezda			

U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba sačuvati oba organa. Klinički i drugi nalazi mogu sugerirati potrebu za pregledom dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve one organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni. U studijama koje uključuju dermalni način primjene treba sačuvati popis organa sastavljen za oralni način primjene, s tim da je vrlo važno specifično uzorkovanje i čuvanje kože s mjesta primjene. U studijama inhalacijom popis sačuvanih i ispitanih tkiva iz respiratornog trakta treba slijediti preporuke Poglavlja B.8 ovog Priloga (8) i Poglavlja B.29 ovog Priloga (9). Za ostale organe/tkiva (te uz posebno sačuvana tkiva iz respiratornog trakta) treba ispitati popis organa zadan za oralni način primjene.

Histopatologija

48. Dostupna je smjernica za najbolju praksu u provođenju istraživanja toksikološke patologije (32). Minimalne histopatološke pretrage moraju uključivati:

— sva tkiva iz skupine izložene visokoj dozi i kontrolne skupine,

— sva tkiva životinja uginulih ili usmrćenih tijekom studije,

— sva tkiva s makroskopskim anomalijama,

— tkiva mete ili tkiva koja pokazuju promjene povezane s tretiranjem u skupini izloženoj visokoj dozi, od svih životinja u svih drugim skupinama doza,

— u slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba ispitati oba organa.

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

49. Treba pružiti pojedinačne podatke o životinjama za sve ocijenjene parametre. Uz to sve podatke treba skupiti u obliku tablice, prikazujući za svaku ispitnu skupinu broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga te vrijeme smrti ili usmrćivanja, broj uočenih znakova toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme nastupanja, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog učinka, broj životinja s lezijama, tip lezija te postotak životinja sa svakim tipom lezije. Tablice sa sažetkom podataka trebaju pružiti prosječne i standardne devijacije (za podatke trajnih ispitivanja) za životinje koje pokazuju toksične učinke ili lezije uz stupnjevanje lezija.

50. U tumačenju rezultata studije, npr. u slučaju kada postoje indikacije da su podaci dobiveni u paralelnim kontrolama bitno izvan granica u usporedbi sa skorašnjim podacima od kontrolnih životinja iz istog ispitnog smještaja/kolonije, mogu biti dragocjeni povijesni kontrolni podaci. Povijesne kontrolne podatke, ako se ocjenjuju, treba uzeti iz istog laboratorija i povezati sa životinjama iste dobi i vrste proizvedenih tijekom pet godina prije dotične studije.

51. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti prikladnom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode i podatke koji će se analizirati treba odabrati tijekom planiranja studije (stavak 8.). Ako je potrebno, odabir treba osigurati prilagodbu radi preživljavanja.

Izvješće o ispitivanju

52. U izvješću o ispitivanju treba navesti sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalna narav, čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci,

— podrijetlo kemikalije,

— broj serije,

— potvrda kemijske analize.

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje odabira nosača (ako nije voda).

Pokusne životinje:

— korištene vrste/sojevi te obrazloženje odabira,

— broj, dob i spol životinja na početku ispitivanja,

▼M4

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— pojedinačne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja.

Uvjeti ispitivanja:

— argumentacija za način primjene i odabir doze,

— ako je primjenjivo, statistička metoda korištena za analizu podataka,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije/hrane,

— analitički podaci o postignutoj koncentraciji, stabilnosti i homogenosti preparata,

— način primjene i pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— za studije inhalacijom, bilo samo nosom ili čitavim tijelom,

— stvarne doze (mg/kg tjelesne mase po danu) i faktor pretvorbe iz koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (mg/kg ili ppm) sa stvarnom dozom ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Rezultati (treba prikazati tablično sažete podatke i pojedinačne podatke za životinje):

— podaci o preživljavanju,

— tjelesna masa/promjene u tjelesnoj masi,

— unos hrane, izračun učinkovitosti hrane ako je napravljen te unos vode ako je primjenjivo,

— podaci o toksičkim reakcijama po spolu i visini doza, uključujući znakove toksičnosti,

— narav, učestalost (te ako je zabilježeno, ozbiljnost) i trajanje kliničkih opažanja (prolaznih ili trajnih),

— oftalmološki pregledi,

— hematološke pretrage,

— kliničko-biokemijske pretrage,

— analiza urina,

— ishod svih istraživanja neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti,

— tjelesna masa na kraju,

— mase organa (i njihovi omjeri ako je primjenjivo),

— nalazi obdukcije,

— detaljan opis svih histopatoloških nalaza povezanih s tretiranjem,

— podaci o apsorpciji, ako postoje.

▼M4

Statistička obrada rezultata po potrebi

Rasprava o rezultatima uključujući:

— Odnose doza i reakcija,

— Razmatranja o svim načinima djelovanja informacija,

— Rasprava o svim modelima pristupa,

— Određivanje BMD, NOAEL ili LOAEL,

— Povijesni kontrolni podaci,

— Relevantnost za ljude.

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (1995.). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

2. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

5. Poglavlje B.27 ovog Priloga, Test subkronične oralne toksičnosti - 90-dnevna studija oralne toksičnosti na neglodavcima uz primjenu ponavljanih doza.

6. OECD (2012.). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

8. Poglavlje B.8 ovog Priloga, Subakutna inhalacijska toksičnost: 28-dnevna studija.

9. Poglavlje B.29 ovog Priloga, Subkronična inhalacijska toksičnost: 90-dnevna studija.

10. Poglavlje B.9 ovog Priloga, Toksičnost (dermalna) pri ponavljanoj dozi (28 dana).

11. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

12. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

13. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

14. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

15. OECD (2002.). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

16. OECD (2000.). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

17. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19. Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se upotrebljavaju u znanstvene svrhe, SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

26. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

27. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

28. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

29. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

30. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

31. EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK i sur. (2004). Smjernica za najbolju praksu: Toksikološka histopatologija, Toksikološka patologija 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼B

B.31. STUDIJA PRENATALNE RAZVOJNE TOKSIČNOSTI

1. METODA

Ova je metoda istovjetna metodi OECD TG 414 (2001.).

1.1. UVOD

Ova metoda za ispitivanje razvojne toksičnosti namijenjena je za dobivanje općih podataka o učincima prenatalne izloženosti na gravidnu pokusnu životinju i na organizam koji se razvija u maternici; tu može biti uključena procjena učinaka na majku, kao i smrt, strukturne abnormalnosti ili promijenjeni rast fetusa. Funkcionalni nedostaci, iako čine važan dio razvoja, nisu sastavni dio ove ispitne metode. Oni se mogu ispitivati u nekoj drugoj studiji ili kao dodatak ovaj studiji, uz primjenu metode ispitivanja razvojne neurotoksičnosti. Radi informiranja o ispitivanju funkcionalnih nedostataka i drugih postnatalnih učinaka treba razmotriti ispitnu metodu za studiju dvogeneracijske reproduktivne toksičnosti ili studiju razvojne neurotoksičnosti, prema potrebi.

Ova ispitna metoda može u pojedinačnim slučajevima zahtijevati posebne prilagodbe na osnovi posebnih saznanja o npr. fizikalno kemijskim ili toksikološkim svojstvima ispitivane tvari. Takva je prilagodba prihvatljiva ako uvjerljivi znanstveni dokazi pokazuju da će se testom nakon prilagodbe dobiti više informacija. U takvom slučaju, spomenute znanstvene dokaze treba temeljito dokumentirani u studiji.

1.2. DEFINICIJE

Razvojna toksikologija: studija o štetnim učincima na organizam u razvoju, koji mogu biti posljedica izlaganja prije začeća, tijekom prenatalnog razvoja ili postnatalno do vremena spolne zrelosti. Glavne manifestacije razvojne toksičnosti uključuju: 1. smrt organizma, 2. strukturne abnormalnosti, 3. promijenjen rast, 4. funkcionalne nedostatke. Razvojna toksikologija prije se često nazivala teratologijom.

Štetni učinak: svaka promjena normalnih vrijednosti povezana s tretiranjem, koja umanjuje sposobnost organizma za preživljavanje, razmnožavanje ili prilagođavanje okolišu. Kad je povezan s razvojnom toksikologijom, ovaj pojam u najširem smislu obuhvaća svaki učinak koji sprečava normalan razvoj konceptusa prije i nakon rođenja.

Promijenjen rast: promjena mase ili veličine organa ili tijela potomka.

Promjene (anomalije): strukturne promjene u razvoju koje uključuju i malformacije i varijacije.

Malformacija/velika abnormalnost: strukturna promjena koja se smatra štetnom za životinju (može isto tako biti i smrtonosna) koja se obično rijetko javlja.

▼B

Varijacija/manja abnormalnost: strukturna promjena za koju se smatra da ima neznatan ili nikakav štetni učinak na životinju; može biti privremena i relativno često se može pojaviti u kontrolnoj populaciji.

Konceptus (zametak): ukupni derivati oplođenog jajašca u bilo kojoj fazi razvoja od oplodnje do rođenja, uključujući izvanembrionalne ovojnice, kao i embrij ili fetus.

Implantacija (nidacija): pričvršćenje blastociste za epitelni sloj maternice, uključujući njezino prodiranje kroz epitel maternice i ugnježđenje u endometrij.

Embrij: rana ili razvojna faza bilo kojeg organizma, posebno razvojni produkt oplodnje jajašca nakon pojave uzdužne osi i do nastanka svih glavnih struktura.

Embriotoksičnost: toksičnost koja ima štetni učinak na normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja embrija.

Fetus: nerođeni potomak u post-embrionalnoj fazi.

Fetotoksičnost: toksičnost koja ima štetni učinak na normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja fetusa.

Pobačaj: prijevremeno izbacivanje proizvoda začeća iz maternice: embrija ili fetusa koji nije sposoban za preživljavanje.

Resorpcija: pojava kad se konceptus, koji odumre nakon ugnježđenja u maternicu, resorbira ili je već resorbiran.

Rana resorpcija: dokaz o implantiranju bez prepoznatljivog embrija/fetusa.

Kasna resorpcija: mrtvi embrij ili fetus s vanjskim degenerativnim promjenama.

NOAEL: skraćenica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka (No Observed Adverse Effect Level) i najviša je doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci vezani uz tretiranje.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Obično se ispitivana tvar daje gravidnim životinjama najmanje od implantacije do jednog dana prije dana planiranog usmrćivanja, koji mora biti što bliži danu normalnog poroda bez rizika od gubitka podataka zbog preranog poroda. Ova ispitna metoda nije namijenjena samo za ispitivanje razdoblja organogeneze (tj. 5-15 dana kod glodavaca i 6-18 dana kod kunića), nego i za ispitivanje učinaka od vremena prije implantacije, prema potrebi, kroz cijelo razdoblje gestacije do dana koji prethodi carskom rezu. Neposredno prije carskog reza ženke se usmrćuju, sadržaj maternice pregledava, a kod ploda se traže vanjske vidljive anomalije, kao i promjene na mekim tkivima i kosturu.

▼B

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Odabir životinjske vrste**

Preporuča se da se ispitivanje obavlja na najrelevantnijim vrstama, te da se upotrebljavaju laboratorijske vrste i sojevi koji se obično koriste za ispitivanja prenatalne razvojne toksičnosti. Preporučena vrsta glodavca je štakor, a preporučena vrsta neglodavca je kunić. Kad god se koriste životinje drugih vrsta, treba navesti opravdane razloge.

1.5.2. **Uvjeti smještaja i hranjenja životinja**

Temperatura u prostoriji gdje se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C) za glodavce i 18 °C (± 3 °C) za kuniće. Iako bi relativna vlažnost zraka trebala biti najmanje 30 % i po mogućnosti ne prelaziti 70 % osim za vrijeme čišćenja prostorije, ciljna bi vrijednost trebala biti 50-60 %. Osvjetljenje treba biti umjetno i u slijedu se izmjenjivati 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Što se hranjenja tiče, može se primjenjivati uobičajena laboratorijska prehrana uz neograničene količine vode za piće.

Postupak parenja treba provoditi u kavezima koji su prikladni za tu svrhu. Iako je životinje koje su se parile najbolje smjestiti pojedinačno, prihvatljiv je i smještaj u malim skupinama.

1.5.3. **Priprema životinja**

Treba koristiti zdrave životinje koje su se barem 5 dana privikavale na laboratorijske uvjete i koje prethodno nisu bile podvrgavane ispitnim postupcima. Pokusne životinje treba okarakterizirati s obzirom na njihovu vrstu, soj, podrijetlo, spol, tjelesnu masu i/ili dob. Tjelesna bi masa i starost životinja u svim pokusnim skupinama trebala biti ujednačena u najvećoj mogućoj mjeri. Za svaku visinu doze treba koristiti mlade odrasle ženke koje još nisu imale potomstvo. Ženke se trebaju pariti s mužjacima iste vrste i soja, a parenje između braće i sestara treba izbjegavati. Kod glodavaca nulti dan gestacije je dan kad se opazi vaginalni čep i/ili sperma; za kuniće je nulti dan obično dan koitusa ili umjetne oplodnje, ako se primjenjuje ta tehnika. Parene ženke treba nasumično rasporediti u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog njihovog položaja svedu na minimum. Svakoj se životinji dodjeljuje jedinstveni identifikacijski broj. Parene ženke se nasumično raspoređuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati, a ako su se parile skupno, životinje iz svake skupine jednakomjerno treba rasporediti u skupine za tretiranje i kontrolu. Isto tako, ženke koje je oplodio isti mužjak treba ujednačeno rasporediti po skupinama.

1.6. POSTUPAK

1.6.1. **Broj i spol životinja**

Svaka ispitivana i kontrolna skupina treba sadržavati dovoljan broj ženki koji će za obdukciju osigurati oko 20 ženki s implantima. Skupine s manje od 16 životinja s implantima mogu biti nedovoljne. Nije nužno da će smrtnost majki ugroziti studiju, pod uvjetom da nije viša od oko 10 %.

▼B

1.6.2. **Priprema doza**

Ako se radi lakšeg doziranja koristi nosač ili neki drugi dodatak, treba obratiti pozornost na sljedeće karakteristike: djelovanje na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i zadržavanje ili izlučivanje ispitivane tvari; djelovanje na kemijska svojstva ispitivane tvari koja mogu izmijeniti njene toksičke karakteristike; djelovanje na unos hrane ili vode ili na uhranjenost životinja. Nosač ne smije imati toksično djelovanje u vrijeme razvoja niti smije djelovati na reprodukciju.

1.6.3. **Doziranje**

Obično se ispitivana tvar primjenjuje svakodnevno, od implantacije (npr. 5. dan nakon parenja) do dana prije planiranog carskog reza. Ako preliminarne studije, kada se rade, ne upućuju na veliku vjerojatnost predimplantacijskoga gubitka, tretiranje se može produžiti kroz cijelo razdoblje gestacije, od parenja do dana koji prethodi planiranom usmrćivanju. Dobro je poznato da neprimjereno postupanje ili stres tijekom gravidnosti mogu dovesti do prenatalnih gubitaka. Radi zaštite od prenatalnoga gubitka uslijed faktora nevezanih uz tretiranje, treba izbjegavati nepotrebno rukovanje gravidnim životinjama, kao i stres izazvan vanjskim faktorima kao što je buka.

Koriste se najmanje tri visine doze i parelelna kontrola. Zdrave životinje nasumce se raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Doze različitih visina treba primijeniti u određenim vremenskim razmacima kako bi se dobila gradacija toksičkog učinka. Ako nije ograničena fizikalno kemijskom prirodom ili biološkim svojstvima ispitivane tvari, najviša doza odabire se s ciljem da izazove određenu razvojnu toksičnost i/ili toksičnost za majku (klinički znakovi ili smanjenje tjelesne mase), ali ne i smrt ili tešku patnju životinja. Najmanje jedna od srednjih doza treba proizvesti minimalne toksične učinke koji se mogu promatrati. Najniža doza ne smije proizvesti nikakav dokaz toksičnosti, niti za majku niti za plod u razvoju. Nakon toga treba odabrati niz sve nižih doza kako bi se pokazale sve reakcije vezane uz doziranje, i na kraju najnižu dozu kod koje nema vidljivih toksičkih učinaka (NOAEL). Za utvrđivanje slijeda silaznih doza često je najbolje doze primijeniti u dva do četiri kraća intervala te je često bolje dodati četvrtu ispitnu skupinu nego između dva doziranja imati jako dugi interval (npr. faktor veći od 10). Iako je cilj utvrđivanje NOAEL-a za majku, studije u kojima se ta visina doze ne utvrđuje mogu isto tako biti prihvatljive (1).

Visine doza treba birati uzimajući u obzir postojeće podatke o toksičnosti, kao i dodatne informacije o metabolizmu i toksikinetici ispitivane tvari ili srodnih materijala. Te će informacije također biti od pomoći kod dokazivanja primjerenosti režima doziranja.

Istodobno treba koristiti i kontrolnu skupinu. Ta skupina treba biti placebo kontrolna skupina ili kontrolna skupina tretirana samo nosačem, ako se kod primjene ispitivane tvari koristi nosač. Svim skupinama treba dozirati isti volumen ispitivane tvari ili nosača. Sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati na jednak način kao sa životinjama u tretiranim skupinama. Kontrolne skupine tretirane nosačem trebaju primiti najvišu korištenu količinu nosača (kao i skupina tretirana najnižom dozom ispitivane tvari).

▼B

1.6.4. **Granični test**

Ako test pri jednoj visini doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan, koja se primjenjuje oralno prema postupku opisanom za ovu studiju, ne proizvede vidljive toksičke učinke niti kod gravidnih ženki niti kod njihovog potomstva i ako se učinci ne očekuju na temelju postojećih podataka (npr. o strukturno i/ili metabolički srodnim spojevima) potpuna studija uz primjenu tri visine doza može se smatrati nepotrebnom. Očekivana ljudska izloženost može ukazati na potrebu da se u graničnom testu primijeni viša oralna doza. Za druge vrste primjene, kao što su inhalacijska i dermalna, fizikalno-kemijska svojstva ispitivane tvari često mogu indicirati ili ograničavati najvišu moguću razinu izloženosti (na primjer, dermalna primjena ne smije uzrokovati jaku lokalnu toksičnost).

1.6.5. **Primjena doza**

Ispitivana tvar ili nosač obično se primjenjuje oralno, intubacijom. Ako se koristi drugi put primjene, osoba koja obavlja test mora opravdati i obrazložiti svoj izbor, a možda će biti potrebne i odgovarajuće izmjene (2)(3)(4). Ispitivanu tvar treba primjenjivati svakog dana po prilici u isto vrijeme.

Doza koja se daje pojedinačnim životinjama obično se temelji na zadnje izmjerenoj tjelesnoj masi. Međutim, kod prilagođavanja doze tijekom posljednje trećine gravidnosti potreban je oprez. Kod odabira doze treba koristiti postojeće podatke kako bi se spriječila previsoka toksičnost za majku. Međutim, ako se kod tretiranih ženki opazi previsoka toksičnost, te životinje treba humano usmrtiti. Ako nekolicina gravidnih životinja pokaže znakove previsoke toksičnosti, treba razmotriti prekid pokusa na skupini koja prima tu dozu. Ako se tvar primjenjuje oralnom intubacijom, najbolje je životinjama dati jednu dozu pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Ako se kao nosač koristi kukuruzno ulje, taj volumen ne smije biti veći od 0,4 ml/100 g tjelesne mase. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije, kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen.

1.6.6. **Opažanje ženki**

Klinička opažanja treba obavljati i bilježiti barem jednom dnevno, najbolje svaki dan u isto vrijeme, uzimajući u obzir vršno razdoblje predviđenog djelovanja nakon doziranja. Bilježi se stanje životinja, uključujući smrtnost, stanje umiranja, relevantne promjene u ponašanju i sve jasne znakove toksičnosti.

1.6.7. **Tjelesna masa i unos hrane**

Životinje treba vagati na nulti ili najkasnije treći dan gestacije u slučaju da vanjski uzgajivač isporučuje već parene životinje, zatim prvi dan doziranja, tijekom razdoblja doziranja najmanje svaki treći dan i na dan predviđenog usmrćivanja.

▼B

Unos hrane treba bilježiti u trodnevnim intervalima, na iste dane kad se mjeri i tjelesna masa životinja.

1.6.8. **Pregled post-mortem**

Ženke treba usmrtiti jedan dan prije očekivanog dana koćenja. Ženke koje pokazuju simptome pobačaja ili preranog koćenja prije planiranog usmrćivanja treba usmrtiti i podvrgnuti temeljitom makroskopskom pregledu.

Na kraju studije ili u slučaju smrti u tijeku studije, ženke treba maksroskopski pregledati radi otkrivanja bilo kakvih strukturnih abnormalnosti ili patoloških promjena. Ocjenjivanje stanja majki tijekom carskog reza i naknadne analize fetusa treba po mogućnosti obaviti ne znajući kojoj tretiranoj skupini pripadaju, kako bi se pristranost pri donošenju ocjene svela na minimum.

1.6.9. **Pregled sadržaja maternice**

Odmah po svršetku studije, odnosno čim je prije moguće nakon smrti, treba odstraniti maternice i utvrditi stanje gravidnosti životinja. Maternice koje ne izgledaju gravidne treba dalje pregledati (npr. bojenje amonijevim sulfidom kod glodavaca i bojenje metodom po Salewskom ili nekom drugom prikladnom metodom kod kunića) kako bi se potvrdilo da nema graviditeta (5).

Gravidne maternice, uključujući cerviks (vrat maternice) treba izvagati. Masa gravidne maternice ne mjeri se kod životinja koje su uginule tijekom studije.

Kod gravidnih životinja utvrđuje se broj žutih tijela (*corpora lutea*).

Kod sadržaja maternice utvrđuje se broj mrtvih embrija ili fetusa i broj fetusa sposobnih za preživljavanje. Da bi se procijenilo relativno vrijeme smrti zametka (vidjeti odjeljak 1.2.) treba opisati stupanj resorpcije.

1.6.10. **Pregled fetusa**

Treba utvrditi spol i tjelesnu masu svakog fetusa.

Svaki se fetus pregledava radi utvrđivanja vanjskih promjena (6).

Pregledom se kod fetusa utvrđuju promjene na kosturu i mekim tkivima (npr. varijacije i malformacije ili anomalije) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Kategorizacija fetalnih promjena je poželjna, ali se ne zahtijeva. Ako se radi kategorizacija, jasno treba navesti kriterije za utvrđivanje svake kategorije. Posebnu pozornost treba posvetiti reproduktivnom traktu koji se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja.

Kod glodavaca treba pripremiti oko polovine svakog legla i pregledom utvrditi promjene na kostima. Na ostatku legla pregledom se utvrđuju promjene na mekim tkivima, uz primjenu prihvaćenih i odgovarajućih metoda serijskih rezova ili tehnika preciznog makroskopskog seciranja.

▼B

Kod neglodavaca, npr. kunića, kod svih se fetusa pregledom utvrđuju promjene na mekim tkivima i na kostima. Na tijelima tih fetusa promjene na mekim tkivima utvrđuju se preciznim seciranjem koje može uključivati i postupke za daljnju analizu unutarnje strukture srca (25). Glave polovice fetusa pregledanih na ovaj način treba odstraniti i obraditi za analizu promjena na mekim tkivima (uključujući oči, mozak, nosne šupljine i jezik) uz primjenu standardnih metoda serijskih rezova (26) ili neke druge jednako osjetljive metode. Tijela tih fetusa i preostale cijele fetuse treba obraditi i pregledati radi utvrđivanja promjena na kostima, uz primjenu istih metoda koje su opisane za glodavce.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Podaci se bilježe pojedinačno za svaku ženku kao i za njeno potomstvo i rezimiraju u obliku tablice, gdje se za svaku pokusnu skupinu i svaku generaciju navodi broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja uginulih tijekom ispitivanja ili usmrćenih iz humanih razloga, vrijeme svake smrti, odnosno svakog humanog usmrćenja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis opaženih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i težinu svih toksičkih učinaka, vrste opažanja obavljenih na embrijima/fetusima i svi relevantni podaci o leglima.

Brojčani se rezultati ocjenjuju odgovarajućom statističkom metodom, pri čemu je leglo jedinica za analizu podataka. Treba upotrijebiti neku opće prihvaćenu statističku metodu; statističke metode se odabiru u okviru plana studije i njihov odabir treba obrazložiti. Podaci o životinjama koje nisu preživjele do planiranog usmrćivanja također se navode u izvješću. Ti se podaci mogu uključiti u srednje vrijednosti za skupinu tamo gdje je to relevantno. Relevantnost podataka dobivenih od takvih životinja, pa prema tome i uključivanje ili isključivanje iz srednjih vrijednosti za bilo koju skupinu, treba obrazložiti i ocijeniti na individualnoj osnovi.

2.2. **OCJENA REZULTATA**

Nalazi studije prenatalne razvojne toksičnosti ocjenjuju se u okviru promatranih učinaka. Ocjena obuhvaća slijedeće informacije:

— rezultate ispitivanja majke i embrija/fetusa, uključujući procjenu ili nepostojanje odnosa između izloženosti životinja ispitivanoj tvari i pojave i težine svih utvrđenih promjena,

— kriterije korištene za kategorizaciju vanjskih promjena, promjena na mekim tkivima i kostima fetusa, ako je kategorizacija napravljena,

▼B

— kad je primjereno, podatke o kontrolama iz ranijih ispitivanja, radi boljeg tumačenja rezultata studije,

— brojeve upotrijebljene u izračunu svih postotaka ili indeksa,

— odgovarajuću statističku analizu nalaza studije, tamo gdje je primjereno, koja treba obuhvaćati dovoljno informacija o metodi analize kako bi nezavisni revizor/statističar mogao ponovo rekonstruirati i ocijeniti analizu.

U svakoj studiji koja pokazuje nepostojanje toksičkih učinaka treba razmotriti mogućnost daljnjeg istraživanja s ciljem utvrđivanja apsorpcije i bioraspoloživosti ispitivane tvari.

2.3. TUMAČENJE REZULTATA

Studija prenatalne razvojne toksičnosti dat će informacije o učincima ponavljanog izlaganja ispitivanoj tvari tijekom gravidnosti na ženke i na intrauterini razvoj njihovih potomaka. Rezultate studije treba tumačiti zajedno s nalazima subkroničnih, reprodukcijskih, toksikokinetičkih i drugih studija. Kako je naglasak stavljen i na opću toksičnost, u smislu toksičnosti za majku, i na konačne toksične učinke na razvoj potomstva, rezultati studije omogućuju da se do neke mjere razlikuju razvojni učinci koji se javljaju bez prisutnosti opće toksičnosti i onih koji se javljaju samo kod doza koje su toksične za majku (27).

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće specifične informacije:

ispitivana tvar:

— fizikalna svojstva, i gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijska oznaka, uključujući CAS broj ako je poznat/utvrđen,

— čistoća.

Nosač (prema potrebi):

— obrazloženje za odabir nosača, ako nije u pitanju voda.

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta i soj,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo životinja, uvjeti držanja, prehrana itd.

— tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku ispitivanja.

Uvjeti ispitivanja:

— obrazloženje za odabir visine doze,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari/pripravi hrane, postignutim koncentracijama, stabilnosti i homogenosti pripravka,

▼B

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari,

— metoda preračunavanja koncentracije ispitivane tvari predviđene za primjenu putem hrane ili vode (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), ovisno o slučaju,

— okolišni uvjeti,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Rezultati:

Podaci o toksičkim reakcijama majke po dozama, uključujući, no ne ograničavajući se na:

— broj životinja na početku ispitivanja, broj preživjelih životinja, broj gravidnih ženki i broj pobačaja, broj životinja koje su se prerano okotile,

— dan smrti tijekom studije, odnosno jesu li životinje preživjele do završetka ispitivanja,

— podatke o životinjama koje nisu preživjele do planiranog usmrćivanja treba navesti, ali ih se ne uključuje u statističke usporedbe između skupina,

— dan opažanja svakog kliničkog znaka abnormalnosti i kasnije promjene,

— tjelesnu masu, promjenu tjelesne mase i masu gravidne maternice, uključujući, neobvezno, promjenu tjelesne mase korigiranu za masu gravidne maternice,

— unos hrane i, ako je mjeren, unos vode,

— nalaze obdukcije, uključujući masu maternice,

— treba navesti visine doza bez vidljivih toksičkih učinaka na majku i na razvoj ploda.

Konačni razvojni toksički učinci po dozama za legla s implantima, uključujući:

— broj žutih tijela,

— broj implantacija, broj i postotak živih i mrtvih fetusa i resorpcija,

— broj i postotak gubitaka prije i poslije implantacije.

Krajnji razvojni učinci po dozama za legla sa živim fetusima, uključujući:

— broj i postotak živih potomaka,

— omjer spolova,

— tjelesnu masu fetusa, po mogućnosti za svaki spol zasebno i kombinirano za oba spola,

— vanjske malformacije, malformacije mekih tkiva i kostiju i druge relevantne promjene,

— kriterije za kategorizaciju, ako je primjereno,

▼B

— ukupan broj i postotak fetusa i legala s bilo kakvim vanjskim promjenama i promjenama na mekim tkivima i kostima, kao i vrste i učestalost pojedinačnih anomalija i drugih relevantnih promjena.

Diskusija o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Kavlock R.J. et al., (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; str. 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z., (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; str. 386-398.

(3) Wong, B.A., et al., (1997) Developing Specialised Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; str. 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency, (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E., (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 247, 367.

(6) Edwards, J.A., (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16, str. 171-173.

(8) Igarashi, E. et al., (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32, str. 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology*, 47 str. 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology*, 127, str. 291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology*, 11 str. 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 9, str. 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology*, 8, str. 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology*, 46, str. 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, str. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy*, 41, str. 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology*, 39, str. 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy*, 36, str. 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 4, str. 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, str. 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY. (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*, 28, str. 233-239.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*, 28, str. 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology*, 9, str. 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, str. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register*, 56, str. 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology, 55, str. 249-292.

▼M4

B.32. STUDIJE KARCINOGENOSTI

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 451 (2009.). Originalna Smjernica za ispitivanje 451 o studijama karcinogenosti usvojena je 1981. Smatralo se da je nužno razviti ovu revidiranu ispitnu metodu B.32 kako bi se odrazio skorašnji razvoj u području dobrobiti životinja i regulatornih zahtjeva (2) (3) (4) (5) (6). Ova ispitna metoda B.32 ažurirana je paralelno s revizijama Poglavlja B.30 ovog Priloga, Studije kronične toksičnosti te Poglavlja B.33 ovog Priloga, Kombinirane studije kronične toksičnosti/karcinogenosti te s ciljem pribavljanja dodatnih informacija od životinja korištenih u studiji te prikupljanja daljnjih pojedinosti o odabiru doze. Ova ispitna metoda B.32 namijenjena je primjeni u ispitivanju širokog spektra kemikalija, uključujući pesticide i industrijske kemikalije. No, treba imati na umu da neke pojedinosti i zahtjevi mogu biti različiti za ljude (vidjeti Smjernicu S1B o Ispitivanju kancerogenosti lijekova Međunarodne konferencije o usklađivanju (*International conference on Harmonisation* (ICH)).

2. Većina studija karcinogenosti provodi se na vrstama glodavaca, stoga i ovu ispitnu metodu treba primjenjivati prvenstveno u studijama koje se provode na tim vrstama. Ako se traži da se studije provode na neglodavcima, treba primijeniti načela i postupke izložene u ovoj ispitnoj metodi uz odgovarajuće modifikacije zajedno s načelima i postupcima izloženima u Poglavlju B.27 ovog Priloga, Studija subkronične oralne toksičnosti-90-dnevna studija oralne toksičnosti na neglodavcima uz primjenu ponavljanih doza (6)-. Ostale upute dostupne su u Smjernici br. 116. o planiranju i provođenju studija kronične toksičnosti i kancerogenosti (7).

3. Tri glavna načina primjene korištena u studijama kancerogenosti jesu oralni, dermalni i inhalacijski. Odabir načina primjene ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije te o pretežnom načinu izlaganja ljudi. Dodatne informacije o odabiru načina izlaganja navedene su u Smjernici br. 116. (7).

4. Ova ispitna metoda usmjerena je na izlaganje oralnim putem, što je najčešće korišteni način u studijama karcinogenosti. Dok dugotrajne studije karcinogenosti, koje uključuju izlaganje preko kože ili inhalacijom, mogu također biti potrebne i/ili se mogu tražiti pod određenim regulatornim režimima radi određivanja rizika za ljude, oba načina izlaganja uključuju znatnu tehničku složenost. Takve studije treba planirati za svaki slučaj posebno iako ovdje izložena ispitna metoda za određivanje i ocjenu karcinogenosti putem oralne primjene može poslužiti kao temelj za protokol za studije inhalacijom i/ili dermalnim putem, uzimajući u obzir razdoblja tretiranja, kliničke i patološke parametre itd. Dostupna je OECD-ova Smjernica za primjenu ispitivane kemikalije dermalnim (7) i inhalacijskim putem (7) (8). Poglavlje B.8 ovog Priloga (9) i Poglavlje B.29 ovog Priloga (10), zajedno sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje akutne inhalacije (8), treba poslužiti kao detaljna konzultacija pri planiranju dugotrajnijih studija koje uključuju izlaganje inhalacijom. Poglavlje B.9 ovog Priloga (11) treba uzeti kao pomoć pri ispitivanju provedenom dermalnim putem.

▼M4

5. Studija karcinogenosti pruža informacije o mogućim rizicima za zdravlje koji će se vjerojatno pojaviti zbog ponovljenog izlaganja kroz gotovo čitavo ili čitavo životno razdoblje korištenih vrsta. Ta će studija pružiti informacije o toksičnim učincima ispitivane kemikalije, uključujući i potencijalnu karcinogenost te može ukazati na organe mete i mogućnost akumulacije. Može pružiti procjenu razine neopaženih štetnih učinaka te u slučaju negenotoksičnih karcinogena za tumorske reakcije koje se mogu upotrijebiti za određivanje sigurnosnih kriterija za izlaganje ljudi.– Također je naglašena potreba za pažljivim kliničkim opažanjima životinja radi dobivanja što je moguće više informacija.

6. Ciljevi studija karcinogenosti obuhvaćenih ovom ispitnom metodom uključuju:

— Identifikaciju karcinogenih svojstava ispitivane kemikalije koja rezultiraju povećanjem učestalosti pojavljivanja neoplazmi, povećanim omjerom malignih neoplazmi ili smanjenjem u vrijeme pojavljivanja neoplazmi u usporedbi s konkurentnim kontrolnim skupinama,

— Identifikaciju organa meta karcinogenosti,

— Identifikaciju vremena pojavljivanja neoplazmi,

— Karakterizaciju odnosa doze i reakcije za tumor,

— Identifikaciju razine neopaženih štetnih učinaka (NOAEL) ili polazne točke za određivanje referente doze za usporedbu (benchmark dose, BMD),

— Ekstrapolaciju karcinogenih učinaka na niskim razinama izlaganja ljudi,

— Pružanje podataka za ispitivanje pretpostavki u svezi s načinom djelovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15).

UVODNA RAZMATRANJA

7. U određivanju i procjeni potencijalne karcinogenosti ispitivane kemikalije laboratorij koji provodi ispitivanje prije provođenja studije mora u obzir uzeti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji kako bi se plan studije usmjerio na učinkovitije ispitivanje potencijala karcinogenosti te kako bi se na minimum svela primjena životinja. Informacije i razmatranja o svim načinima djelovanja karcinogena na koji se sumnja (2) (7) (12) (13) (14) (15) posebno su važne jer se optimalan plan može razlikovati ovisno o tome zna li se ili sumnja za ispitivanu kemikaliju da je genotoksični karcinogen. Ostale upute o razmatranju načina djelovanja mogu se pronaći u Smjernici br. 116 (9).

8. Informacije koje će pomoći u planiranju istraživanja obuhvaćaju identitet, kemijsku strukturu i fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije, rezultate svih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo* uključujući ispitivanja genotoksičnosti; očekivanu/e primjenu/e i potencijal za ljudsko izlaganje, dostupne podatke (Q)SAR, mutagenost/genotoksičnost, karcinogenost i druge toksikološke podatke o kemikalijama srodne strukture, dostupne

▼M4

toksikokinetičke podatke (kinetika jedne doze i ponovljene doze ako je dostupno) te podatke dobivene drugim istraživanjima s ponovljenim izlaganjem. Određivanje karcinogenosti treba provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz 28-dnevnog i/ili 90-dnevnog ispitivanja toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza. Kratkoročno ispitivanje početnog razvoja raka također može pružiti korisne informacije. Pristup s fazama u ispitivanju karcinogenosti treba smatrati dijelom ukupnog utvrđivanja potencijalno nepovoljnih učinaka dotične ispitivane kemikalije po zdravlje (16) (17) (18) (19).

9. Prije početka studije treba odrediti najprikladnije statističke metode za analizu rezultata s obzirom na plan i ciljeve pokusa. Problemi koja treba razmatrati uključuju treba li statistika uključivati prilagodbu preživjelih, analizu ukupnog rizika od tumora u odnosu na trajanje preživljavanja, analizu vremena za stvaranje tumora te analizu u slučaju prijevremenog svršetka jedne ili više skupina. Smjernice o odgovarajućim statističkim analizama i ključnim referencama na međunarodno prihvaćene statističke metode nalaze se u Smjernici br. 116. (7) te također u Smjernici br. 35. za analizu i ocjenu studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (20).

10. Pri provođenju istraživanja karcinogenosti uvijek treba slijediti načela i razloge izložene u OECD-ovoj Smjernici br. 19. o prepoznavanju, određivanju i primjeni kliničkih znakova kao humanih krajnjih ishoda za pokusne životinje korištene u procjeni sigurnosti (21) posebno u stavku 62. U tom stavku stoji da „u studijama uz primjenu ponovljenog doziranja, kada životinje pokazuju progresivne kliničke znakove koji izazivaju daljnje pogoršanje stanja, treba donijeti upućenu odluku o tome treba li humano usmrtiti životinje ili ne. Odluka treba uključivati razloge s obzirom na vrijednost informacija dobivenih iz trajnog održavanja te životinje u studiji s obzirom na njezino opće stanje. Ako se odluči zadržati životinju u ispitivanju, učestalost opažanja treba povećati u skladu s potrebama. Također se može privremeno prekinuti s doziranjem ako će to olakšati patnju ili stres ili smanjiti ispitnu dozu bez štetnih utjecaja na svrhu ispitivanja.”

11. Detaljne upute za načela odabira doza za studije kronične toksičnosti i karcinogenosti te rasprava o njima mogu se pronaći u Smjernici br. 116. (7), kao i u dvije publikacije instituta International Life Sciences Institute (22) (23). Osnovna strategija odabira doza ovisi o primarnom cilju ili primarnim ciljevima studije (stavak 6.). Pri odabiru odgovarajućih razina doza treba postići ravnotežu između procjene opasnosti s jedne strane i karakterizacije reakcija na nisku dozu te njihovo značenje s druge strane. To je posebno relevantno u situaciji u kojoj treba provesti kombiniranu studiju kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga) (stavak 12.).

12. Treba navesti razloge za provođenje kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga), a ne odvojeno provođenje studije kronične toksičnosti (Poglavlje B.30 ovog Priloga) i studije karcinogenosti (ova ispitna metoda B.32). Kombinirano ispitivanje pruža veću učinkovitost što se tiče vremena i troškova u usporedbi s provođenjem dviju zasebnih studija, bez kompromitiranja kvalitete podataka u kroničnoj fazi niti u kancerogenoj fazi. Pri provođenju kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti (Poglavlje B.33 ovog Priloga) treba pažljivo razmisliti o načelima odabira doza (stavci 11. i 22. - 25.) te se također priznaje da pod određenim regulatornim okvirima mogu biti nužne odvojene studije.

▼M4

13. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog poglavlja i u Smjernici br. 116. (7).

NAČELO ISPITIVANJA

14. Ispitivana kemikalija primjenjuje se svakodnevno u stupnjevanim dozama raznim skupinama pokusnih životinja tijekom najvećeg dijela njihova životnog vijeka, obično oralnim putem. Može biti prikladno i ispitivanje inhalacijom ili dermalnim putem. Životinje se pomno promatraju radi znakova toksičnosti i razvoja neoplazmičkih lezija. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

15. Ova ispitna metoda prvenstveno obuhvaća određivanje i ocjenu karcinogenosti u glodavaca (stavak 2.). U obzir se može uzeti primjena vrsta neglodavaca ako dostupni podaci sugeriraju da su oni relevantniji za predviđanje zdravstvenih učinaka po ljude. Treba obrazložiti odabir vrsta. Preferirana vrsta glodavaca jesu štakori iako se mogu upotrijebiti i druge vrste glodavaca, npr. miš. Iako uporaba miševa u ispitivanju karcinogenosti može biti ograničeno korisna (24) (25) (26), u nekim aktualnim regulatornim programima još se uvijek traži ispitivanje karcinogenosti u miševa osim ako je utvrđeno da nema znanstvene potrebe za takvom studijom. Štakori i miševi preferirani su pokusni modeli zbog relativno kratkog životnog vijeka, raširene primjene u farmakološkim i toksikološkim studijama, osjetljivosti na izazivanje tumora te dostupnosti dovoljno karakteriziranih sojeva. Kao posljedica tih svojstava, dostupno je mnogo informacija o njihovoj fiziologiji i patologiji. Dodatne informacije o odabiru vrsta i sojeva navedene su u Smjernici br. 116. (7).

16. Treba upotrijebiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji su uobičajeni u laboratorijskoj praksi. Studiju karcinogenosti treba po mogućnosti obaviti na životinjama istog soja i podrijetla kao i životinje korištene u preliminarnoj/im studiji/-ama toksičnosti kraćeg trajanja ako se za životinje tog soja i podrijetla zna da imaju problema u postizanju uobičajeno prihvaćenih kriterija za preživljavanje u dugotrajnim istraživanjima [vidjeti Smjernicu br. 116. (9)], treba razmotriti primjenu životinjskog soja s prihvatljivom stopom preživljavanja za dugotrajnu studiju. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne.

Smještaj i hranjenje

17. Životinje moraju biti smještene pojedinačno ili u kavezima u malim skupinama istog spola; pojedinačni smještaj treba uzeti u obzir samo ako je znanstveno opravdan (27) (28) (29). Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Temperatura u prostoriji s pokusnim životinjama trebala bi iznositi 22 °C (± 3 °C). Premda bi relativna vlažnost zraka trebala iznositi najmanje 30 % te po mogućnosti ne premašivati 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50 - 60 %. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može primjenjivati konvencionalna laboratorijska prehrana uz neograničene količine pitke vode. Prehrana mora

▼M4

ispunjavati sve nutritivne potrebe ispitivanih vrsta, a udio tvari koje kontaminiraju hranu - uključujući ostatke pesticida, postojane organske zagađivače, fitoestrogene, teške metale i mikotoksine, ali ne ograničeno na njih - koje mogu utjecati na rezultat ispitivanja treba biti što je moguće manji. Analitičke informacije o razinama tvari koje kontaminiraju hranjive tvari i prehranu treba izrađivati periodično, barem na početku studije te u slučaju promjene u primijenjenoj seriji, i treba ih uključiti u završno izvješće. Također treba pružiti analitičke informacije o vodi za piće korištenoj u istraživanju. Na odabir prehrane može utjecati potreba za osiguranjem prikladnih dodataka ispitivane kemikalije i ispunjavanjem nutritivnih potreba životinja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje kroz hranu.

Priprema životinja

18. Treba upotrijebiti zdrave životinje koje su se aklimatizirale na laboratorijske uvjete najmanje sedam dana i koje nisu izlagane prethodnim pokusnim postupcima. U slučaju glodavaca doziranje životinja treba početi što je moguće prije nakon prestanka odbijanja od sise i aklimatizacije te po mogućnosti prije nego što životinje navrše osam tjedana. Ispitne životinje treba karakterizirati što se tiče vrste, soja, podrijetla, spola, mase i starosti. Na početku studije odstupanje u masi za svaki spol korištenih životinja mora biti minimalno i ne smije biti veće od ± 20 % prosječne mase svih životinja u studiji, posebno za svaki spol. Životinje treba nasumično odrediti za kontrolne i ispitne skupine. Nakon nasumičnog odabira ne smije biti značajne razlike u prosječnoj tjelesnoj masi između skupina svakog spola. U slučaju statistički značajnih razlika treba ponoviti fazu nasumičnog odabiranja ako je moguće. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj i treba je trajno označiti tim brojem tetovažom, ugradnjom mikročipa ili drugom odgovarajućom metodom.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

19. Treba upotrijebiti oba spola. Treba upotrijebiti dovoljan broj životinja tako da se omogući temeljita biološka i statistička ocjena. Stoga svaka skupina koja prima dozu i paralelna kontrolna skupina moraju sadržavati najmanje 50 životinja svakog spola. Ovisno o namjeni studije, može biti moguće povećati statističku snagu ključnih procjena drukčijom raspodjelom životinja tako da bude drukčija u raznim skupinama koje primaju dozu s više od 50 životinja u skupinama s niskom dozom, npr. radi procjene karcinogenog potencijala na niskim dozama. No, treba priznati da umjereno povećanje skupine daje relativno malo povećanje statističke snage studije. Daljnje informacije o statističkom planiranju studije i odabiru visina doza radi povećanja statističke snage na maksimum nalaze se u Smjernici br. 116. (7).

Odabir za usmrćivanje u međuvremenu i satelitske (indikatorske) skupine

20. Studija može omogućivati usmrćivanje u međuvremenu, npr. s 12 mjeseci, kako bi se pribavile informacije o napredovanju neoplazmičkih promjena i mehanističke informacije ako je to znanstveno opravdano. Ako su takve informacije već dostupne iz prethodnih studija toksičnosti ispitivane kemikalije uz primjenu ponavljanih doza, usmrćivanje u međuvremenu nije znanstveno opravdano. Ako su usmrćivanja u međuvremenu uključena u plan studije, broj životinja u svakoj skupini koja prima dozu određen za usmrćivanje u međuvremenu obično će biti deset životinja svakog spola, a ukupni broj životinja uključenih u plan studije treba povećati za broj životinja određenih za usmrćivanje prije završetka studije. Ako je potrebno, tijekom studije može se uključiti i dodatna skupina indikatorskih životinja (tipično pet životinja po spolu) radi nadzora stanja bolesti (30). Ostale upute nalaze se u Smjernici br. 116. (7).

▼M4

Skupine za doziranje i doziranje

21. Smjernice u vezi sa svim aspektima odabira doza i razmak među visinama doza nalaze se u Smjernici br. 116. (7). Treba upotrijebiti najmanje tri visine doza i paralelnu kontrolu. Visine doza općenito se temelje na rezultatima kraćih studija uz primjenu ponavljanih doza ili studija za određivanje raspona i u obzir moraju uzeti sve toksikološke i toksikokinetičke podatke dostupne o ispitivanoj kemikaliji ili srodnim kemikalijama.

22. Osim ako nije ograničeno fizikalno-kemijskom prirodom ili biološkim učincima ispitivane kemikalije, obično treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se identificirali organi mete i toksični učinci uz izbjegavanje patnje, ozbiljne toksičnosti, bolježljivosti ili smrti. Uzimajući u obzir čimbenike izložene u stavku 23. u nastavku, obično treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se izveli dokazi o toksičnosti kao što je, primjerice, dokazano padom povećanja tjelesne mase (otprilike 10 %). No, ovisno o ciljevima studije (vidjeti stavak 6.), može se odabrati najviša visina doze manja od doze koja pruža dokaze o toksičnosti npr. ako doza izaziva štetan, zabrinjavajuć učinak koji unatoč tomu utječe na životni vijek ili tjelesnu masu.

23. Visine doza i razmaci između visina doza mogu se odabrati kako bi se odredio ishod doza-reakcija i, ovisno o načinu djelovanja ispitivane kemikalije, NOAEL ili drugi namjeravani ishod studije, npr. BMD (vidjeti stavak 25.) na najnižoj visini doze. Čimbenici koje treba uzeti u obzir pri dodjeljivanju nižih doza uključuju očekivani nagib krivulje doze i reakcije, doze na kojima se mogu dogoditi važne promjene u metabolizmu ili načinu toksičnog djelovanja, gdje se očekuje prag ili gdje se očekuje polazna točka za ekstrapolaciju za niske doze.

24. Odabrani razmak između visina doza ovisit će o svojstvima ispitivane kemikalije i ova ispitna metoda ne može ga propisati, ali dva do četiri intervala smanjenja često pružaju dobro uspješnost ispitivanja za određivanje silaznih visina doza, a često se daje prednost dodavanju četvrte ispitne skupine nego primjeni vrlo velikih intervala (npr. više nego čimbenik između 6 - 10) među dozama. Općenito treba izbjegavati primjenu faktora većih od deset i treba ih opravdati ako se primjenjuju.

25. Kao što je izloženo u nastavku Smjernice br. 116. (7), točke koje treba uzeti u obzir pri odabiru doze uključuju:

— Poznate nelinearnosti ili točke savijanja u odnosu doze i reakcije ili one na koje se sumnja,

— Toksikokinetiku i raspone doza u kojima se događaju ili ne događaju metabolička indukcija, zasićenje ili nelinearnost između vanjskih i unutarnjih doza,

— Prethodne lezije, markeri učinka ili indikatori operacije ključnih temeljnih bioloških procesa,

— Ključni aspekti ili načini djelovanja (ili oni na koje se sumnja), poput doza na kojima počinje rasti citotoksičnost, razina hormona se poremeti, homeostatski mehanizmi uništavaju itd.,

▼M4

— Regije krivulje doze i reakcije gdje je potrebna posebno jaka procjena, npr. u rasponu očekivanog BMD-a ili praga na koji se sumnja,

— Uzimanje u obzir očekivanih razina ljudskog izlaganja.

26. Kontrolna skupina mora biti netretirana skupina ili skupina za kontrolu nosača ako se u primjeni ispitivane kemikalije primjenjuje nosač. Osim radi tretiranja ispitivanom kemikalijom, životinje u kontrolnoj skupini treba tretirati na jednak način kao i životinje u ispitnim skupinama. Ako se primjenjuje nosač, kontrolna skupina mora primiti nosač u najvećoj količini primijenjenoj u skupinama koje primaju doze. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu i ako izaziva značajno smanjeno unosa hrane zbog smanjene tečnosti hrane, može biti korisna dodatna kontrolna skupina koja se hrani u paru kako bi poslužila za primjereniju kontrolu.

Priprema doza i primjena ispitivane kemikalije

27. Ispitivana kemikalija obično se daje oralno, kroz hranu ili vodu za piće ili pak sondom. Dodatne informacije o načinima i metodama davanja navedene su u Smjernici br. 116. (7). Način i metoda primjene ovise o svrsi studije, fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, njezinoj bioraspoloživosti te pretežnom načinu i metodi izlaganja ljudi. Treba predočiti argumentaciju za odabrani način i metodu primjene. Radi dobrobiti životinja oralnu sondu valja upotrijebiti samo za sredstva za koja taj način i metoda primjene opravdano predstavljaju potencijalno izlaganje ljudi (npr. lijekovi). Kemikalije iz hrane ili okoliša, uključujući pesticide, obično se primjenjuju kroz hranu ili vodu za piće. No, u nekim je situacijama, npr. pri radnom izlaganju, prikladnije izlaganje na druge načine.

28. Po potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. U obzir treba uzeti sljedeća svojstva nosača i drugih aditiva po potrebi: učinke na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili retenciju ispitivane kemikalije; učinke na kemijska svojstva ispitivane kemikalije koja se mogu promijeniti u toksična svojstva te učinke na unos hrane ili vode ili nutritivnog statusa životinja. Preporučuje se da se, kada je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/suspenzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače različite od vode moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Moraju biti dostupne informacije o stabilnosti ispitivane kemikalije i homogenosti otopina za doziranje ili prehranu (ono što je odgovarajuće) pod uvjetima primjene (npr. prehrana).

29. Kod kemikalija koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. U dugotrajnim studijama toksičnosti uz primjenu davanja kroz hranu koncentracija ispitivane kemikalije u hrani obično ne smije premašiti gornju granicu od 5 % ukupne hrane kako bi se izbjegla nutritivna neravnoteža. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu, može se upotrijebiti konstantna koncentracija u hrani (hrana mg/kg ili ppm) ili konstantna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje (mg/kg tjelesne mase) izračunata na tjednoj bazi. Treba specificirati korištenu alternativu.

▼M4

30. U slučaju oralne primjene životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija (sedam dana tjedno) obično u razdoblju od 24 mjeseca za glodavce (vidjeti i stavak 32.). Svaki drukčiji režim primjene, npr. pet dana tjedno, treba obrazložiti. U slučaju dermalne primjene životinje se ispitivanom kemikalijom obično tretiraju najmanje šest sati dnevno, sedam dana tjedno, kao što je navedeno u Poglavlju B.9 ovog Priloga (11), u razdoblju od 24 mjeseci. Izlaganje inhalacijom provodi se šest sati dnevno, sedam dana tjedno, ali može se primijeniti i izlaganje pet dana ako je opravdano. Razdoblje izlaganja obično traje 24 mjeseci. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanje izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Treba pružiti argumentaciju za primjenu izlaganja kraćeg od šest sati dnevno. Vidjeti također i Poglavlje B.8 ovog Priloga (9).

31. Ako se ispitivana kemikalija životinjama daje sondom, to treba provesti želučanom sondom ili prikladnom intubacijskom kanilom u slično vrijeme svakog dana. Obično se jedanput dnevno daje jedna doza, primjerice u slučajevima kada je kemikalija lokalni iritans, no moguće je zadržati dnevnu količinu doze na način da je se podijeli (dvaput dnevno). Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Količinu treba održavati toliko niskom da bude praktična, a obično ne bi trebala biti veća od 1 ml/100 g tjelesne mase za glodavce (31). Varijabilnost u ispitnoj količini treba svesti na minimum prilagodbom koncentracije kako bi se osigurala konstantna količina na svim visinama doze. Iznimku predstavljaju potencijalno nagrizajuće ili nadražujuće kemikalije te ih treba razrijediti kako bi se izbjegli ozbiljni lokalni učinci. Treba izbjegavati ispitivanje na koncentracijama koje su vjerojatno nagrizajuće ili nadražujuće za gastrointestinalni trakt.

Trajanje studije

32. Studija obično traje 24 mjeseci za glodavce, što predstavlja najveći dio uobičajenog životnog vijeka korištenih životinja. Mogu se primijeniti kraće ili dulje studije, ovisno o životnom vijeku vrste životinja korištenih u studiji, ali to treba obrazložiti. Za specifične sojeve miševa, npr. AKR/J, C3H/J ili C57BL/6J, može biti prikladnije trajanje od 18 mjeseci. U nastavku se nalaze neke upute u vezi s trajanjem, završetkom studije i preživljavanjem; ostale upute uključujući razmatranja o prihvatljivosti negativne karcinogenosti povezane s preživljavanjem u studiji nalaze se u OECD-ovoj Smjernici br. 116. o planiranju i provođenju studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (7).

— Završetak studije treba uzeti u obzir kada broj preživjelih u skupinama s nižim dozama ili kontrolnoj skupini padne na manje od 25 %.

— Ako samo skupina s visokom dozom prijevremeno ugine zbog toksičnosti, to ne smije izazvati završetak studije.

— Treba posebno bilježiti preživljavanje svakog spola.

— Studija ne treba trajati dulje od točke u kojoj podaci dostupni iz studije više nisu dovoljni za omogućivanje statistički valjane ocjene.

▼M4

OPAŽANJA

33. Sve životinje treba pregledati radi bolježljivosti ili ugibanja, obično na početku i kraju svakog dana uključujući vikend i praznike. Životinje treba dodatno jedanput dnevno prekontrolirati radi specifičnih znakova od toksikološke važnosti uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja u slučaju davanja sondom. Posebnu pažnju valja obratiti na razvoj tumora, te treba zabilježiti vrijeme nastanka tumora, lokaciju, dimenzije, izgled i napredovanje svakog makroskopski vidljivog ili palpabilnog tumora.

Tjelesna masa, unos hrane/vode i učinkovitost hrane

34. Sve životinje treba izvagati na početka tretiranja, najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Mjerenja unosa i učinkovitosti hrane treba provoditi najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Unos vode treba mjeriti najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno ako se kemikalija primjenjuje preko vode za piće. Mjerenje unosa vode treba također uzeti u obzir i za studije u kojima se mijenja aktivnost pijenja.

Hematologija, klinička biokemija i druga mjerenja

35. Kako bi se na maksimum povećala količina informacija dobivenih iz studije, posebno za način djelovanja, mogu se uzeti uzorci krvi za hematologiju i kliničku biokemiju, o čemu odlučuje voditelj istraživanja. Također može biti prikladna i analiza urina. Ostale upute o vrijednosti uzimanja tih uzoraka kao dio studije karcinogenosti nalaze se u Smjernici br. 116. (7). Ako se smatra prikladnim, uzorkovanje krvi za hematološke i kliničko-kemijske pretrage te analiza urina mogu se provesti kao dio usmrćivanja u međuvremenu (stavak 20.) te na kraju studije na najmanje dest životinja svakog spola u svakoj skupini. Uzorke krvi treba uzimati iz određenog mjesta, primjerice punkcijom srca ili iz retroorbitalnog sinusa, pod anestezijom te pohraniti pod odgovarajućim uvjetima ako je potrebno. Razmazi krvi također se mogu pripremiti za pretrage, posebno ako se čini da je organ meta koštana srž, iako se propituje vrijednosti takvih pretraga za određivanje karcinogenog/onkogenog potencijala (32).

PATOLOGIJA

Makroskopska analiza

36. Sve životinje u studiji, osim indikatorskih životinja (vidjeti stavak 20.) i drugih satelitskih životinja, moraju se podvrgnuti potpunoj, detaljnoj makroskopskoj obdukciji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušnje šupljine i njihovog sadržaja. Indikatorske životinje mogu zahtijevati obdukciju u pojedinačnim slučajevima, a odluka je prepuštena voditelju istraživanja. Mase organa nisu uobičajeni dio studije karcinogeneze budući da gerijatrijske promjene te, u kasnijim fazama, razvoj tumora remete korisnost podataka o masi organa. No mogu biti ključne pri provođenju ocjene težine dokaza te posebno za razmatranje o načinu djelovanja. Ako su dio satelitske studije, treba ih skupiti ne kasnije od godine dana nakon početka studije.

▼M4

37. Sljedeća tkiva treba čuvati u najprikladnijem fiksacijskom mediju za oba tipa tkiva i namjeravane histopatološke pretrage koja slijedi (33) (tkiva u uglatim zagradama opcijska su):

sve makroskopske lezije	srce	gušterača	želudac (predželudac, žljezdani želudac)
nadbubrežna žlijezda	ileum	paraštitna žlijezda	[zubi]
aorta	jejunum	periferni živac	testis
mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	bubreg	hipofiza	timus
cekum	suzna žlijezda (eksorbitalna)	prostata	štitnjača
cerviks	jetra	rektum	[jezik]
koagulacijska žiljezda	pluća	žlijezda slinovnica	dušnik
debelo crijevo	limfni čvorovi (površinski i dubinski)	sjemenski mjehurić	mokraćni mjehur
dvanaesnik	mliječna žlijezda (obvezno za ženke i ako se mogu secirati, od mužjaka)	skeletni mišić	maternica (uključujući cerviks)
epididimis	[gornji respiratorni trakt uključujući nos, turbinate i paranazalne sinuse]	koža	[mokraćovod]
oko (uključujući mrežnicu)	jednjak	kralježnica (na tri razine: vratna, srednja prsna i slabinska)	[mokraćna cijev]
[femur sa zglobom]	[olfaktorni bulbus]	slezena	vagina
žučni mjehur (za vrste drukčije od štakora)	jajnik	[prsna kost],	sekcija koštane srži i/ili aspirat svježe koštane srži
Harderova žlijezda			

U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba sačuvati oba organa. Klinički i drugi nalazi mogu sugerirati potrebu za pregledom dodatnih tkiva. Treba također sačuvati sve organe za koje se smatra da bi mogli biti meta na temelju poznatih svojstava ispitivane kemikalije. U studijama koje uključuju dermalni način primjene treba sačuvati popis organa sastavljen za oralni način primjene, s tim da je vrlo važno specifično uzorkovanje i čuvanje kože s mjesta primjene. U studijama inhalacijom popis sačuvanih i ispitanih tkiva iz respiratornog trakta treba slijediti preporuke Poglavlja B.8 i B.29 ovog Priloga. Za ostale organe/tkiva (te uz posebno sačuvana tkiva iz respiratornog trakta) treba ispitati popis organa zadan za oralni način primjene.

▼M4

Histopatologija

38. Dostupna je smjernica za najbolju praksu u provođenju istraživanja toksikološke patologije (33). Minimum tkiva na kojima su obavljene pretrage mora uključivati:

— Sva tkiva iz skupina izloženih visokoj dozi i kontrolnih skupina,

— Sva tkiva životinja uginulih ili usmrćenih tijekom studije,

— Sva tkiva s makroskopskim anomalijama uključujući tumore,

— Ako se u skupini izloženoj visokoj dozi opaze histopatološke promjene povezane s tretmanom, ta tkiva treba analizirati na svim životinjama u svim skupinama izloženima drugim dozama,

— U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba ispitati oba organa.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

39. Treba pružiti pojedinačne podatke o životinjama za sve ocijenjene parametre. Uz to sve podatke treba skupiti u obliku tablice, prikazujući za svaku ispitnu skupinu broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga te vrijeme smrti ili usmrćivanja, broj uočenih znakova toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme nastupanja, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog učinka, broj životinja s lezijama, tip lezija te postotak životinja sa svakim tipom lezije. Tablice sa sažetkom podataka trebaju pružiti prosječne i standardne devijacije (za podatke trajnih ispitivanja) za životinje koje pokazuju toksične učinke ili lezije uz stupnjevanje lezija.

40. U tumačenju rezultata studije, npr. u slučaju kada postoje indikacije da su podaci dobiveni u paralelnim kontrolama bitno izvan granica u usporedbi sa skorašnjim podacima od kontrolnih životinja iz istog ispitnog smještaja/kolonije, mogu biti dragocjeni povijesni kontrolni podaci. Povijesne kontrolne podatke, ako se ocjenjuju, treba uzeti iz istog laboratorija i povezati sa životinjama iste dobi i vrste proizvedenih tijekom pet godina prije dotične studije.

41. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti prikladnom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode i podatke koji će se analizirati treba odabrati tijekom planiranja studije (stavak 9.). Ako je potrebno, odabir treba osigurati prilagodbu radi preživljavanja.

Izvješće o ispitivanju

42. U izvješću o ispitivanju treba navesti sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalna narav, čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci,

▼M4

— podrijetlo kemikalije,

— broj serije,

— potvrda kemijske analize,

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje odabira nosača (ako nije voda),

Pokusne životinje:

— korištene vrste/sojevi te obrazloženje odabira,

— broj, dob i spol životinja na početku ispitivanja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— pojedinačna masa životinja na početku ispitivanja,

Uvjeti ispitivanja:

— argumentacija za način primjene i odabir doze,

— ako je primjenjivo, statistička metoda korištena za analizu podataka,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije/hrane,

— analitički podaci o postignutoj koncentraciji, stabilnosti i homogenosti preparata,

— način primjene i pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— za studije inhalacijom, bilo samo nosom ili čitavim tijelom,

— stvarne doze (mg/kg tjelesne mase po danu) i faktor pretvorbe iz koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (mg/kg ili ppm) sa stvarnom dozom ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

Rezultati (treba prikazati tablično sažete podatke i pojedinačne podatke za životinje):

Općenito

— podaci o preživljavanju,

— tjelesna masa/promjene u tjelesnoj masi,

— unos hrane, izračun učinkovitosti hrane ako je napravljen te unos vode,

— ako je primjenjivo,

— toksikokinetički podaci ako su raspoloživi,

— oftalmoloskopija (ako je raspoloživa),

— hematologija (ako je raspoloživa),

— klinička kemija (ako je raspoloživa),

▼M4

Klinički nalazi

— Znakovi toksičnosti,

— Učestalost (te, ako je zabilježena, ozbiljnost) svih anomalija,

— Narav, ozbiljnost i trajanje kliničkih opažanja (prolaznih ili trajnih),

Obdukcijski podaci

— Tjelesna masa na kraju,

— Mase organa i njihovi omjeri ako je primjenjivo,

— Nalazi obdukcije, Učestalost i ozbiljnost anomalija,

Histopatologija

— Neneoplastični histopatološki nalazi,

— Neoplastični histopatološki nalazi,

— Međusobni odnos između makroskopskih i mikroskopskih nalaza,

— Detaljan opis svih histopatoloških nalaza povezanih s tretiranjem, uključujući stupnjeve ozbiljnosti,

— Izvješće svih pregleda objektnih stakalaca mikroskopa provedenih od kolega,

Statistička obrada rezultata po potrebi

Diskusija o rezultatima uključujući

— Diskusiju o svim modelima pristupa,

— Odnos doze i reakcije,

— Povijesne kontrolne podatke,

— Razmatranja o svim načinima djelovanja informacija,

— Određivanje BMD, NOAEL ili LOAEL,

— Relevantnost za ljude,

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (1995.). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

6. Poglavlje B.27 ovog Priloga, Test subkronične oralne toksičnosti - 90-dnevna studija oralne toksičnosti na neglodavcima uz primjenu ponavljanih doza.

7. OECD (2012.). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

9. Poglavlje B.8 ovog Priloga, Subakutna inhalacijska toksičnost: 28-dnevna studija.

10. Poglavlje B.29 ovog Priloga, Subkronična ihnalacijska toksičnost: 90-dnevna studija.

11. Poglavlje B.9 ovog Priloga, Toksičnost (dermalna) pri ponavljanoj dozi (28 dana).

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

20. OECD (2002.). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

21. OECD (2000.). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

▼**M4**

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

27. Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se upotrebljavaju u znanstvene svrhe, SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32. Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

33. Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Smjernica za najbolju praksu: Toksikološka histopatologija, Toksikološka patologija 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M4

B.33. **KOMBINIRANE STUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI/KARCINOGENOSTI**

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 453 (2009.). Originalna Smjernica za ispitivanje 453 usvojena je 1981. Smatralo se da je nužno razviti ovu ažuriranu ispitnu metodu B.33 kako bi se odrazio recentni razvoj u području dobrobiti životinja i regulatornih zahtjeva (1) (2) (3) (4) (5). Ova ispitna metoda B.33 ažurirana je paralelno s revizijama Poglavlja B.32 ovog Priloga, Studije karcinogenosti te Poglavlja B.30 ovog Priloga, Studije kronične toksičnosti s ciljem pribavljanja dodatnih informacija od životinja korištenih u studiji te prikupljanja daljnjih detalja o odabiru doze. Ova ispitna metoda namijenjena je primjeni u ispitivanju širokog spektra kemikalija, uključujući pesticide i industrijske kemikalije. No, treba imati na umu da neke pojedinosti i zahtjevi mogu biti različiti za ljude [vidjeti Smjernicu S1B o Ispitivanju kancerogenosti lijekova Međunarodne konferencije o usklađivanju (*International conference on Harmonisation* (ICH)].

2. Većina studija kronične toksičnosti i karcinogenosti provode se na vrstama glodavaca, stoga i ovu ispitnu metodu treba primjenjivati prvenstveno u studijama koje se provode na tim vrstama. Ako se traži da se takve studije provode na neglodavcima, također se mogu primijeniti izložena načela i postupci uz odgovarajuće modifikacije, zajedno s načelima i postupcima izloženima u Poglavlju B.27 ovog Priloga, Studija subkronične oralne toksičnosti 90-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na ne-glodavcima uz primjenu ponavljanih doza (6), kao što je izloženo u OECD-ovoj Smjernici br. 116. o planiranju i provođenju studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (7).

3. Tri glavna načina primjene upotrijebljena u studijama kronične toksičnosti/karcinogenosti jesu oralni, dermalni i inhalacijski. Odabir načina primjene ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije te o pretežnom načinu izlaganja ljudi. Dodatne informacije o odabiru načina izlaganja navedene su u Smjernici br. 116. (7).

4. Ova ispitna metoda usmjerena je na izlaganje oralnim putem, što je najčešće korišteni način u studijama kronične toksičnosti i karcinogenosti. Dok dugotrajne studije, koje uključuju izlaganje preko kože ili inhalacijom, mogu također biti potrebne i/ili se mogu tražiti pod određenim regulatornim režimima radi određivanja rizika za ljude, oba načina izlaganja uključuju znatnu tehničku složenost. Takve studije treba planirati za svaki slučaj posebno iako ovdje izložena ispitna metoda za određivanje i ocjenu kronične toksičnosti i karcinogenosti putem oralne primjene može poslužiti kao temelj za protokol za studije inhalacijom i/ili dermalnim putem, uzimajući u obzir preporuke za razdoblja tretiranja, kliničke i patološke parametre itd. Dostupna je OECD-ova Smjernica za primjenu ispitivane kemikalije inhalacijom (7) (8) i dermalnim putem (7). Poglavlje B.8 ovog Priloga (9) i Poglavlje B.29 ovog Priloga (10), zajedno sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje akutne inhalacije (8), trebaju poslužiti kao detaljna konzultacija pri planiranju dugotrajnijih studija koje uključuju izlaganje inhalacijom. Poglavlje B.9 ovog Priloga (11) treba uzeti kao pomoć pri ispitivanju provedenom dermalnim putem.

▼M4

5. Kombinirana studija kronične toksičnosti/karcinogenosti pruža informacije o mogućim rizicima za zdravlje koji će se vjerojatno pojaviti zbog ponovljenog izlaganja kroz gotovo čitavo ili čitavo životno razdoblje korištenih vrsta. Ta će studija pružiti informacije o toksičnim učincima ispitivane kemikalije, uključujući i potencijalnu karcinogenost, te može ukazati na organe mete i mogućnost akumulacije. Može pružiti procjenu razine neopaženih štetnih učinaka te, u slučaju negenotoksičnih karcinogena, za tumorske reakcije koje se mogu upotrijebiti za određivanje sigurnosnih kriterija za izlaganje ljudi. Također je naglašena potreba za pažljivim kliničkim opažanjima životinja radi dobivanja što je moguće više informacija.

6. Ciljevi studija kronične toksičnosti/karcinogenosti obuhvaćeni ovom ispitnom metodom uključuju:

— Identifikaciju karcinogenih svojstava ispitivane kemikalije koja rezultiraju povećanjem učestalosti pojavljivanja neoplazmi, povećanim omjerom malignih neoplazmi ili smanjenjem u vrijeme pojavljivanja neoplazmi u usporedbi s paralelnim kontrolnim skupinama,

— Identifikaciju vremena pojavljivanja neoplazmi,

— Identifikaciju kronične toksičnosti ispitivane kemikalije,

— Identifikaciju organa meta kronične toksičnosti i karcinogenosti,

— Karakterizaciju odnosa doze i reakcije,

— Identifikaciju razine neopaženih štetnih učinaka (NOAEL) ili polaznu točku za utvrđivanje referentne doze za usporedbu (benchmark dose, BMD),

— Ekstrapolaciju karcinogenih učinaka na niskim razinama izlaganja ljudi,

— Predviđanje učinaka kronične toksičnosti na razinama ljudskog izlaganja.

— Pružanje podataka za ispitivanje pretpostavki u svezi s načinom djelovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15).

UVODNA RAZMATRANJA

7. U određivanju i procjeni potencijalne karcinogenosti i kronične toksičnosti ispitivane kemikalije laboratorij koji provodi ispitivanje prije provođenja studije mora u obzir uzeti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji kako bi se plan studije usmjerio na učinkovitije ispitivanje toksikoloških svojstava te kako bi se na minimum svela primjena životinja. Informacije i razmatranja o svim načinima djelovanja karcinogena na koji se sumnja (2) (7) (12) (13) (14) (15) posebno su važne jer se optimalan plan može razlikovati, ovisno o tome zna li se ili sumnja za ispitivanu kemikaliju da je genotoksični karcinogen. Ostale upute o razmatranju načina djelovanja mogu se pronaći u Smjernici br. 116. (7).

8. Informacije koje će pomoći u planiranju studije obuhvaćaju identitet, kemijsku strukturu i fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije, sve informacije o načinu djelovanja, rezultate svih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo* uključujući ispitivanja genotoksičnosti, očekivanu/e primjenu/e i potencijal za ljudsko izlaganje, dostupne podatke (Q)SAR, mutagenost/genotoksičnost, karcinogenost i druge toksikološke podatke o kemikalijama srodne strukture, dostupne toksikokinetičke podatke (kinetika jedne doze i ponovljene doze ako je dostupno) te podatke dobivene u drugim studijama s ponovljenim izlaganjem. Određivanje kronične toksičnosti/karcinogenosti

▼M4

treba provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz 28-dnevnog i/ili 90-dnevnog ispitivanja toksičnosti uz primjenu ponovljenih doza. Kratkoročno ispitivanje početnog razvoja raka također može pružiti korisne informacije. Pristup s fazama u ispitivanju karcinogenosti treba smatrati dijelom ukupnog utvrđivanja potencijalno štetnih učinaka dotične ispitivane kemikalije po zdravlje (16) (17) (18) (19).

9. Prije početka studije treba odrediti najprikladnije statističke metode za analizu rezultata s obzirom na plan i ciljeve pokusa. Problemi koja treba razmatrati uključuju treba li statistika uključivati prilagodbu preživjelih, analizu ukupnog rizika od tumora u odnosu na trajanje preživljavanja, analizu vremena za stvaranje tumora te analizu u slučaju prijevremenog svršetka jedne ili više skupina. Smjernice o odgovarajućim statističkim analizama i ključnim referencama na međunarodno prihvaćene statističke metode nalaze se u Smjernici br. 116. (7) te također u Smjernici br. 35. za analizu i ocjenu studija kronične toksičnosti i karcinogenosti (20).

10. Pri provođenju studije karcinogenosti uvijek treba slijediti načela i razloge izložene u OECD-ovoj Smjernici o prepoznavanju, određivanju i primjeni kliničkih znakova kao humanih krajnjih učinaka za pokusne životinje korištene u procjeni sigurnosti (21), a posebno u njezinom stavku 62. U tom stavku stoji da „u studijama uz primjenu ponovljenog doziranja, kada životinje pokazuju progresivne kliničke znakove koji izazivaju daljnje pogoršanje stanja, treba donijeti upućenu odluku o tome treba li humano usmrtiti životinje ili ne. Odluka treba uključivati razloge s obzirom na vrijednost informacija dobivenih iz trajnog održavanja te životinje u studiji s obzirom na njezino opće stanje. Ako se odluči zadržati životinju u ispitivanju, učestalost opažanja treba povećati u skladu s potrebama. Također se može privremeno prekinuti s doziranjem ako će to olakšati patnju ili stres ili smanjiti ispitnu dozu bez štetnih utjecaja na svrhu ispitivanja.”

11. Detaljne upute za načela odabira doza za studije kronične toksičnosti i karcinogenosti te rasprava o njima mogu se pronaći u Smjernici br. 116. (7), kao i u dvije publikacije instituta *International Life Sciences Institute* (22) (23). Osnovna strategija odabira doza ovisi o primarnom cilju ili primarnim ciljevima studije (stavak 6.). Pri odabiru odgovarajućih razina doza treba postići ravnotežu između procjene opasnosti s jedne strane i karakterizacije reakcija na nisku dozu te njihovo značenje s druge strane. To je posebno relevantno u slučaju ove kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti.

12. Treba navesti razloge za provođenje ove kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti, a ne odvojeno provođenje studije kronične toksičnosti (Poglavlje B.30 ovog Priloga) i studije karcinogenosti (Poglavlje B.32 ovog Priloga). Kombinirano ispitivanje pruža veću učinkovitost što se tiče vremena i troškova u usporedbi s provođenjem dviju odvojenih studija, bez kompromitiranja kvalitete podataka u kroničnoj fazi niti u karcinogenoj fazi. Pri provođenju kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti treba pažljivo razmisliti o načelima odabira doza (stavci 11. i 22. - 26.) te se također priznaje da u određenim regulatornim okvirima mogu biti nužne odvojene studije. Daljnje upute za planiranje kombinirane studije kronične toksičnosti i karcinogenosti s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti studije u smislu mogućnosti smanjenja broja korištenih životinja, kao i modernizacije raznih pokusnih postupaka, nalaze se u Smjernici br. 116. (7).

▼M4

13. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se na kraju ovog poglavlja i u Smjernici br. 116. (7).

NAČELO ISPITIVANJA

14. Planiranje studije obuhvaća dvije paralelne faze, kroničnu fazu i fazu karcinogenosti (za trajanje vidjeti redom stavke 34. i 35.). Ispitivana kemikalija obično se primjenjuje oralnim putem iako se može primijeniti i ispitivanje inhalacijom ili dermalnim putem. Za kroničnu fazu ispitivana kemikalija primjenjuje se svakodnevno u postupnim dozama raznim skupinama pokusnih životinja, jedna visina doze po skupini, obično u razdoblju od 12 mjeseci iako se mogu odabrati dulja ili kraća trajanja ovisno o regulatornim zahtjevima (vidjeti stavak 34.). Odabire se dovoljno dugo vrijeme koje bi omogućilo manifestaciju učinaka kumulativne toksičnosti bez miješanja s učincima gerijatrijskih promjena. Planiranje studije također može uključivati jedno ili više usmrćivanja u međuvremenu, npr. s tri i šest mjeseci, i mogu se uključiti dodatne skupine životinja kako bi se to kompenziralo (vidjeti stavak 20.). Za fazu karcinogenosti ispitivana kemikalija primjenjuje se svakodnevno raznim skupinama pokusnih životinja tijekom najvećeg dijela njihova života. Životinje se u objema fazama pomno promatraju radi znakova toksičnosti i razvoja neoplazmičkih lezija. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

15. Ova ispitna metoda prvenstveno obuhvaća određivanje i ocjenu kronične toksičnosti i karcinogenosti u glodavaca (stavak 2.). U obzir se može uzeti primjena vrsta neglodavaca ako dostupni podaci sugeriraju da su oni relevantniji za predviđanje zdravstvenih učinaka po ljude. Treba obrazložiti odabir vrsta. Preferirana vrsta glodavaca jesu štakori iako se mogu upotrijebiti i druge vrste glodavaca, npr. miš. Iako uporaba miševa u ispitivanju karcinogenosti može biti ograničeno korisna (24) (25) (26), u nekim aktualnim regulatornim programima još se uvijek traži ispitivanje karcinogenosti u miševa osim ako je utvrđeno da nema znanstvene potrebe za takvom studijom. Štakori i miševi preferirani su pokusni modeli zbog relativno kratkog životnog vijeka, raširene primjene u farmakološkim i toksikološkim studijama, osjetljivosti na izazivanje tumora te dostupnosti dovoljno karakteriziranih sojeva. Kao posljedica tih svojstava, dostupno je mnogo informacija o njihovoj fiziologiji i patologiji. Plan i provođenje studija kronične toksičnosti/karcinogenosti na vrstama neglodavaca, ako je potrebno, treba temeljiti na načelima izloženima u ovoj ispitnoj metodi zajedno s načelima iz Poglavlja B.27 ovog Priloga, Studija subkronične oralne toksičnosti - 90-dnevna studija oralne toksičnosti na neglodavcima uz primjenu ponavljanih doza (6). Dodatne informacije o odabiru vrste i soja navedene su u Smjernici br. 116. (7).

16. Treba upotrijebiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji su uobičajeni u laboratorijskoj praksi. Kombiniranu studiju kronične toksičnosti/karcinogenosti treba obaviti na životinjama istog soja i podrijetla kao i životinje korištene u preliminarnoj/im studiji/-ama toksičnosti kraćeg trajanja iako, ako se za životinje tog soja i podrijetla zna da imaju problema u postizanju uobičajeno prihvaćenih kriterija za preživljavanje u dugotrajnim studijama [vidjeti Smjernicu br. 116. (7)], treba razmotriti primjenu životinjskog soja s prihvatljivom stopom preživljavanja za dugotrajnu studiju. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne.

▼M4

Uvjeti smještaja i hranjenja

17. Životinje moraju biti smještene pojedinačno ili u kavezima u malim skupinama istog spola; pojedinačni smještaj treba uzeti u obzir samo ako je znanstveno opravdan (27) (28) (29). Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Temperatura u prostoriji s pokusnim životinjama morala bi iznositi 22 °C (± 3 °C). Premda bi relativna vlažnost zraka trebala iznositi najmanje 30 % te po mogućnosti ne premašivati 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50 - 60 %. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može primjenjivati konvencionalna laboratorijska prehrana uz neograničene količine pitke vode. Prehrana mora ispunjavati sve nutritivne potrebe ispitivanih vrsta, a udio tvari koje kontaminiraju hranu - uključujući ostatke pesticida, postojane organske zagađivače, fitoestrogene, teške metale i mikotoksine, ali ne ograničeno na njih - koje mogu utjecati na rezultat ispitivanja treba biti što je moguće manji. Analitičke informacije o razinama tvari koje kontaminiraju hranjive tvari i prehranu treba izrađivati periodično, barem na početku studije te u slučaju promjene u primijenjenoj seriji, i treba ih uključiti u završno izvješće. Također treba pružiti analitičke informacije o vodi za piće korištenoj u istraživanju. Na odabir prehrane može utjecati potreba za osiguranjem prikladnih dodataka ispitivane kemikalije i ispunjavanjem nutritivnih potreba životinja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje kroz hranu.

Priprema životinja

18. Treba upotrijebiti zdrave životinje koje su se aklimatizirale na laboratorijske uvjete najmanje sedam dana i koje nisu izlagane prethodnim pokusnim postupcima. U slučaju glodavaca doziranje životinja treba početi što je moguće prije nakon prestanka odbijanja od sise i aklimatizacije te po mogućnosti prije nego što životinje navrše osam tjedana. Ispitne životinje treba karakterizirati što se tiče vrste, soja, podrijetla, spola, mase i starosti. Na početku studije odstupanje u masi za svaki spol korištenih životinja mora biti minimalno i ne smije biti veće od ± 20 % prosječne mase svih životinja u studiji, posebno za svaki spol. Životinje treba nasumično odrediti za kontrolne i ispitne skupine. Nakon nasumičnog odabira ne smije biti značajne razlike u prosječnoj tjelesnoj masi između skupina svakog spola. U slučaju statistički značajnih razlika treba ponoviti fazu nasumičnog odabiranja ako je moguće. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj i treba je trajno označiti tim brojem tetovažom, ugradnjom mikročipa ili drugom odgovarajućom metodom.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

19. Treba upotrijebiti oba spola. Treba upotrijebiti dovoljan broj životinja tako da se omogući temeljita biološka i statistička ocjena. Stoga za glodavce, svaka skupina koja prima dozu (kao što je izloženo u stavku 22.) i paralelna kontrolna skupina namijenjena za fazu karcinogenosti studije stoga mora sadržavati najmanje 50 životinja svakog spola. Ovisno o cilju studije, može biti moguće povećati statističku snagu ključnih procjena drukčijom raspodjelom životinja tako da bude drukčija u raznim skupinama koje primaju dozu s više od 50 životinja u skupinama s niskom dozom, npr. radi procjene karcinogenog potencijala na niskim dozama. No, treba priznati da umjereno povećanje skupine daje relativno malo povećanje statističke snage studije. Svaka skupina koja prima dozu (kao što je izloženo u stavku 22.) i paralelna kontrolna skupina namijenjena za fazu kronične toksičnosti studije mora sadržavati najmanje deset životinja svakog spola u slučaju glodavaca.

▼M4

Treba imati na umu da je taj broj manji od broja u studiji kronične toksičnosti (Poglavlje B.30 ovog Priloga). Tumačenje podataka dobivenih od smanjenog broja životinja po skupini u fazi kronične toksičnosti ove kombinirane studije bit će poduprto podacima dobivenima od većeg broja životinja u fazi karcinogenosti studije. U studijama koje uključuju miševe u svakoj skupini za doziranje u fazi kronične toksičnosti mogu biti potrebne dodatne životinje kako bi se provele sve tražene hematološke pretrage. Daljnje informacije o statističkom planiranju studije i odabiru visina doza radi povećanja statističke snage na maksimum nalaze se u Smjernici br. 116. (7).

Omogućivanje usmrćivanja u međuvremenu, satelitske skupine i indikatorske životinje

20. Studija može omogućiti usmrćivanje u međuvremenu, npr. sa šest mjeseci za fazu kronične toksičnosti, kako bi se pribavile informacije o napredovanju neoplazmičkih promjena i mehanističke informacije ako je to znanstveno opravdano. Ako su takve informacije već dostupne iz prethodnih studija toksičnosti ispitivane kemikalije uz primjenu ponavljanih doza, usmrćivanje u međuvremenu nije znanstveno opravdano. Životinje upotrijebljene u fazi kronične toksičnosti studije, obično u trajanju od 12 mjeseci (stavak 34.) pružaju podatke o usmrćivanju u međuvremenu za fazu karcinogenosti studije uz postizanje smanjenja ukupnog broja upotrijebljenih životinja. U fazu kronične toksičnosti studije mogu se također uključiti i satelitske skupine radi nadzora reverzibilnosti bilo kakvih toksikoloških promjena izazvanih ispitivanom kemikalijom. To se može ograničiti na najvišu visinu doze u studiji plus kontrola. Ako je potrebno, tijekom studije može se uključiti i dodatna skupina indikatorskih životinja (tipično 5 životinja po spolu) radi praćenja stanja bolesti (30). Daljnje upute za planiranje studije uključuju usmrćivanja u međuvremenu, satelitske i indikatorske životinje uz svođenje na minimum ukupnog broja upotrijebljenih životinja nalaze se u Smjernici br. 116. (7).

21. Ako su u plan studije uključene satelitske životinje i/ili usmrćivanja u međuvremenu, broj životinja u svakoj skupini koja prima dozu određen za tu svrhu obično će biti deset životinja svakog spola, a ukupni broj životinja uključenih u plan studije treba povećati za broj životinja određenih za usmrćivanje prije završetka studije. Životinje za usmrćivanje u međuvremenu i satelitske životinje moraju normalno proći sva opažanja uključujući tjelesnu masu, unos hrane/vode, hematološka i kliničko-biokemijska mjerenja te patološke pretrage kao i životinje u fazi kronične toksičnosti glavne studije iako se također može osigurati (u skupinama za usmrćivanje u međuvremenu) da se mjerenja ograniče na specifična, ključna mjerenja poput neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti.

Skupine za doziranje i doziranje

22. Smjernice u vezi sa svim aspektima odabira doza i razmak među visinama doza nalaze se u Smjernici br. 116. (7). U obje faze, kroničnoj i karcinogenoj, treba primijeniti najmanje tri visine doza i paralelnu kontrolu. Visine doza općenito se temelje na rezultatima kraćih studija uz primjenu ponavljanih doza ili studija za određivanje raspona i u obzir moraju uzeti sve toksikološke i toksikokinetičke podatke dostupne o ispitivanoj kemikaliji ili srodnim kemikalijama.

▼M4

23. Za fazu kronične toksičnosti studije možda neće biti potrebna potpuna studija uz primjenu tri visine doza ako se može pretpostaviti da ispitivanje na jednoj visini doze, jednakoj najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase po danu, neće izazvati štetne učinke. To mora biti utemeljeno na informacijama iz preliminarnih studija te uzevši u obzir da se ne očekuje toksičnost na temelju podataka o kemikalijama srodne strukture. Granica od 1 000 mg/kg tjelesne mase po danu vrijedi osim ako izlaganje ljudi ne pokaže potrebu za primjenom više visine doze.

24. Osim ako nije ograničeno fizikalno-kemijskom prirodom ili biološkim učincima ispitivane kemikalije, obično treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se identificirali organi mete i toksični učinci uz izbjegavanje patnje, ozbiljne toksičnosti, bolježljivosti ili smrti. Obično treba odabrati najvišu visinu doze kako bi se izveli dokazi o toksičnosti kao što je, primjerice, dokazano padom povećanja tjelesne mase (otprilike 10 %). No, ovisno o ciljevima studije (vidjeti stavak 6.) može se odabrati najviša visina doze manja od doze koja pruža dokaze o toksičnosti npr. ako doza izaziva štetan, zabrinjavajući učinak koji unatoč tomu utječe na životni vijek ili tjelesnu masu.

25. Visine doza i razmaci između visina doza mogu se odabrati kako bi se odredio ishod doza-reakcija i, ovisno o načinu djelovanja ispitivane kemikalije, NOAEL ili drugi namjeravani ishod studije, npr. BMD (vidjeti stavak 27.). Čimbenici koje treba uzeti u obzir pri dodjeljivanju nižih doza uključuju očekivani nagib krivulje doze i reakcije, doze na kojima se mogu dogoditi važne promjene u metabolizmu ili načinu toksičnog djelovanja, gdje se očekuje prag ili gdje se očekuje polazna točka za ekstrapolaciju za niske doze. U provođenju kombinirane studije karcinogenosti/kronične toksičnosti primarni će cilj biti dobivanje informacija u svrhe određivanja rizika od karcinogenosti, a informacije o kroničnoj toksičnosti obično će biti dopunski cilj. To treba imati u vidu pri odabiru visina doze i razmaka između visina doza za studiju.

26. Odabrani razmak između visina doza ovisit će o ciljevima studije i svojstvima ispitivane kemikalije i ova ispitna metoda ne može ga detaljno propisati, ali dva do četiri intervala smanjenja često pružaju dobru uspješnost ispitivanja kada se koriste za određivanje silaznih visina doza, a često se prednost dodavanju četvrte ispitne skupine nego primjeni vrlo velikih intervala (npr. više od faktora između 6 - 10) među dozama. Općenito treba izbjegavati primjenu faktora većih od 10 i treba ih opravdati ako se primjenjuju.

27. Kao što je izloženo u nastavku Smjernice br. 116. (7), točke koje treba uzeti u obzir pri odabiru doze uključuju:

— Poznate nelinearnosti ili točke savijanja u odnosu doze i reakcije ili one na koje se sumnja,

— Toksikokinetiku i raspone doza u kojima se događaju ili ne događaju metabolička indukcija, zasićenje ili nelinearnost između vanjskih i unutarnjih doza,

— Prethodne lezije, markeri učinka ili indikatori operacije ključnih temeljnih bioloških procesa,

▼M4

— Ključni aspekti ili načini djelovanja (ili oni na koje se sumnja), poput doza na kojima počinje rasti citotoksičnost, razina hormona se poremeti, homeostatski mehanizmi uništavaju itd.,

— Regije krivulje doze i reakcije gdje je potrebna posebno jaka procjena, npr. u rasponu očekivanog BMD-a ili praga na koji se sumnja,

— Uzimanje u obzir očekivanih razina ljudskog izlaganja, posebno pri odabiru srednjih i niskih doza.

28. Kontrolna skupina mora biti netretirana skupina ili skupina za kontrolu nosača ako se u primjeni ispitivane kemikalije primjenjuje nosač. Osim radi tretiranja ispitivanom kemikalijom, životinje u kontrolnoj skupini treba tretirati na jednak način kao i životinje u ispitnim skupinama. Ako se primjenjuje nosač, kontrolna skupina mora primiti nosač u najvećoj količini primijenjenoj u skupinama koje primaju doze. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu i ako izaziva značajno smanjeno unosa hrane zbog smanjene tečnosti hrane, može biti korisna dodatna kontrolna skupina koja se hrani u paru kako bi poslužila za primjereniju kontrolu.

Priprema doza i primjena ispitivane kemikalije

29. Ispitivana kemikalija obično se daje oralno, kroz hranu ili vodu za piće ili pak sondom. Dodatne informacije o načinima i metodama davanja navedene su u Smjernici br. 116. (7). Način i metoda primjene ovisi o svrsi studije, fizikalnim/kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, njezinoj bioraspoloživosti te pretežnom načinu i metodi izlaganja ljudi. Treba predočiti argumentaciju za odabrani način i metodu primjene. Radi dobrobiti životinja sondu valja upotrijebiti samo za sredstva za koje taj način i metoda primjene opravdano predstavljaju potencijalno izlaganje ljudi (npr. lijekovi). Kemikalije iz hrane ili okoliša, uključujući pesticide, obično se primjenjuju kroz hranu ili vodu za piće. No, u nekim je situacijama, npr. pri radnom izlaganju, prikladnije izlaganje na druge načine.

30. Po potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. U obzir treba uzeti sljedeća svojstva nosača i drugih aditiva po potrebi: učinke na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili retenciju ispitivane kemikalije; učinke na kemijska svojstva ispitivane kemikalije koja se mogu promijeniti u toksična svojstva te učinke na unos hrane ili vode ili nutritivnog statusa životinja. Preporučuje se da se, kada je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/suspenzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače različite od vode moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Moraju biti dostupne informacije o stabilnosti ispitivane kemikalije i homogenosti otopina za doziranje ili prehranu (odgovarajući) pod uvjetima primjene (npr. prehrana).

31. Kod kemikalija koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. U dugotrajnim studijama toksičnosti uz primjenu davanja kroz hranu koncentracija ispitivane kemikalije u hrani obično ne smije premašiti gornju granicu od 5 % ukupne hrane kako bi se izbjegla nutritivna neravnoteža. Ako se ispitivana kemikalija daje kroz hranu, može se upotrijebiti konstantna koncentracija u hrani (hrana mg/kg ili ppm) ili konstantna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje (mg/kg tjelesne mase) izračunata na tjednoj bazi. Treba specificirati korištenu alternativu.

▼M4

32. U slučaju oralne primjene životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija (sedam dana tjedno) obično u razdoblju od 12 mjeseci (kronična faza) ili 24 mjeseca (faza karcinogenosti), vidjeti stavke 33. i 34. Svaki drukčiji režim primjene, npr. pet dana tjedno, treba obrazložiti. U slučaju dermalne primjene životinje se ispitivanom kemikalijom obično tretiraju najmanje šest sati dnevno, sedam dana tjedno, kao što je navedeno u Poglavlju B.9 ovog Priloga (11), u razdoblju od 12 mjeseci (kronična faza) ili 24 mjeseca (faza karcinogenosti). Izlaganje inhalacijom provodi se šest sati dnevno, sedam dana tjedno, ali može se primijeniti i izlaganje pet dana ako je opravdano. Razdoblje izlaganja obično će trajati 12 mjeseci (kronična faza) ili 24 mjeseca (faza karcinogenosti). Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego drugi glodavci, maksimalno trajanje izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za tu vrstu. Treba pružiti argumentaciju za primjenu izlaganja kraćeg od šest sati dnevno. Vidjeti također i Poglavlje B.8 ovog Priloga (9).

33. Ako se ispitivana kemikalija životinjama daje sondom, to treba provesti želučanom sondom ili prikladnom intubacijskom kanilom u slično vrijeme svakog dana. Obično se jedanput dnevno daje jedna doza, primjerice u slučajevima kada je kemikalija lokalni iritans, no moguće je zadržati dnevnu količinu doze na način da je se podijeli (dvaput dnevno). Maksimalni volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Količinu treba održavati toliko niskom da bude praktična, a obično ne bi trebala biti veća od 1 ml/100 g tjelesne mase za glodavce (31). Varijabilnost u ispitnoj količini treba svesti na minimum prilagodbom koncentracije kako bi se osigurala konstantna količina na svim visinama doze. Iznimku predstavljaju potencijalno nagrizajuće ili nadražujuće kemikalije te ih treba razrijediti kako bi se izbjegli ozbiljni lokalni učinci. Treba izbjegavati ispitivanje na koncentracijama koje su vjerojatno nagrizajuće ili nadražujuće za gastrointestinalni trakt.

Trajanje studije

34. Razdoblje doziranja i trajanje kronične faze ove studije obično je 12 mjeseci iako plan studije također dopušta i primjenu kraćeg (npr. 6 ili 9 mjeseci) ili duljeg (npr. 18 ili 24 mjeseca) trajanja studije, ovisno o zahtjevima posebnih regulatornih režima ili radi specifičnih mehanističkih svrha. Treba obrazložiti odstupanja od trajanja izlaganja od 12 mjeseci, posebno u slučajevima kraćeg trajanja. Sve skupine koje primaju dozu dodijeljene toj fazi bit će završene u određeno vrijeme radi ocjene kronične toksičnosti i neoplastične patologije. Satelitske skupine uključene radi nadzora reverzibilnosti bilo kakvih toksikoloških promjena izazvanih ispitivanom kemikalijom tijekom studije treba održavati bez doziranja u razdoblju ne kraćem od četiri tjedna te ne dulje od trećine ukupnog trajanja studije nakon prestanka izlaganja.

35. Faza karcinogenosti studije obično traje 24 mjeseca za glodavce, što predstavlja najveći dio uobičajenog životnog vijeka korištenih životinja. Mogu se primijeniti kraće ili dulje studije, ovisno o životnom vijeku soja životinja korištenih u studiji, ali to treba obrazložiti. Za specifične sojeve miševa, npr. AKR/J, C3H/J ili C57BL/6J, može biti prikladnije trajanje od 18 mjeseci. U nastavku se nalaze neke upute u vezi s trajanjem, završetkom studije i preživljavanjem; ostale upute uključujući razmatranja o prihvatljivosti studije negativne karcinogenosti povezane s preživljavanjem u studiji nalaze se u OECD-ovoj Smjernici br. 116. (7):

▼M4

— Završetak studije treba uzeti u obzir kada broj preživjelih u skupinama s nižim dozama ili kontrolnoj skupini padne na manje od 25 %.

— Ako samo skupina s visokom dozom prijevremeno ugine zbog toksičnosti, to ne smije izazvati završetak studije.

— Treba posebno bilježiti preživljavanje svakog spola.

— Studija ne treba trajati dulje od točke u kojoj podaci dostupni iz studije više nisu dovoljni za omogućivanje statistički valjane ocjene.

OPAŽANJA (FAZA KRONIČNE TOKSIČNOSTI)

36. Sve životinje treba pregledati radi bolježljivosti ili ugibanja, obično na početku i kraju svakog dana, uključujući vikend i praznike. Opća klinička opažanja valja provoditi najmanje jedanput dnevno, po mogućnosti u isto vrijeme/ista vremena svakog dana te uzimajući u obzir vršno razdoblje očekivanih učinaka nakon doziranja u slučaju primjene sondom.

37. Detaljna klinička opažanja valja provoditi na svim životinjama najmanje jedanput prije prvog izlaganja (kako bi se omogućila usporedba za svaku jedinku), na kraju prvog tjedna studije te zatim mjesečno. Protokol za opažanja treba organizirati tako da se na minimum svedu varijacije između pojedinih promatrača i ovisno o ispitnoj skupini. Ta opažanja treba obaviti izvan domicilnog kaveza, po mogućnosti u standardnoj areni te svaki put u slično vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti sustav vrednovanja jasno definiran od strane laboratorija koji obavlja ispitivanje. Treba se potruditi osigurati da su varijacije u uvjetima opažanja minimalne. Opaženi simptomi moraju obuhvaćati, ali ne biti ograničeni na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu sekreta i ekskreta te aktivnost autonomnog živčanog sustava (npr. lakrimacija (suzenje), piloerekcija (naježenost dlake), veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Također treba zabilježiti promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug) ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (32).

38. Oftalmološke preglede uz primjenu oftalmoskopa ili druge odgovarajuće opreme treba obaviti na svim životinjama prije prve primjene ispitivane kemikalije. Na kraju studije te preglede treba po mogućnosti obaviti na svim životinjama, ali barem u skupini s visokom dozom i kontrolnoj skupini. Ako se na očima opaze promjene povezane s tretiranjem, treba pregledati sve životinje. Ako strukturna analiza ili druge informacije upućuju na okularnu toksičnost, treba povećati učestalost oftalmoloških pregleda.

39. Za kemikalije za koje prethodne 28-dnevne i/ili 90-dnevne studije toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza ukazuju na potencijalno uzrokovanje neurotoksičnih učinaka, senzoričke reaktivnosti na stimulanse različitih tipova (32) (npr. zvučne, vizualne i proprioceptivne stimulanse) (33) (34) (35), prije početka studije te u razdobljima od 3 mjeseca nakon početka studije pa do 12 mjeseci, uključujući i 12. mjesec, te na kraju studije (ako ne traje dulje od 12 mjeseci) mogu se opcijski provesti i određivanje jakosti stiska (36) i određivanje motoričke aktivnosti (37). Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, osim referentnih mogu se primjenjivati i drugi postupci.

▼M4

40. Za kemikalije, za koje su prethodne 28-dnevne i/ili 90-dnevne studije toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza ukazala na potencijalno izazivanje imunotoksičnih učinaka, na kraju se opcijski mogu provesti daljnja istraživanja tog krajnjeg učinka.

Tjelesna masa, unos hrane/vode i učinkovitost hrane

41. Sve životinje treba izvagati na početka tretiranja, najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Mjerenja unosa i učinkovitosti hrane treba provoditi najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Unos vode treba mjeriti najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno ako se kemikalija primjenjuje preko vode za piće. Mjerenje unosa vode treba također uzeti u obzir i za studije u kojima se mijenja aktivnost pijenja.

Hematologija i klinička biokemija

42. U studijama koje uključuju glodavce hematološke pretrage treba obaviti na svim pokusnim životinjama (deset mužjaka i deset ženki iz svake skupine) nakon 3, 6 i 12 mjeseci te na kraju studije (ako ne traje dulje od 12 mjeseci). Kod miševa mogu biti potrebne satelitske životinje kako bi se provele sve potrebne hematološke pretrage (vidjeti stavak 19.). Kod studija na neglodavcima uzorci se uzimaju od manjeg broja životinja (npr. četiri životinje po spolu i skupini kod studija na psima), u vrijeme uzorkovanja u međuvremenu te na kraju, kao što je opisano za glodavce. Mjerenja nakon tri mjeseca, bilo u glodavaca ili neglodavaca, ne moraju se provoditi ako na hematološkim parametrima u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivim visinama doze nisu uočeni učinci. Uzorke krvi treba uzimati iz određenog mjesta, primjerice punkcijom srca ili iz retroorbitalnog sinusa, pod anestezijom.

43. Treba ispitati sljedeći popis parametara (38): ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj eritrocita, broj trombocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit (volumen eritrocita), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječnu masu hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (MCHC), protrombinsko vrijeme te aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. Ostali hematološki parametri poput Heinzovih tjelešaca ili druge atipične morfologije eritrocita ili methemoglobin mogu se mjeriti po potrebi, ovisno o toksičnosti ispitivane kemikalije. Općenito gledano, treba primijeniti fleksibilan pristup ovisno o opaženim i/ili očekivanim učincima davane ispitivane kemikalije. Ako ispitivana kemikalija ne utječe na hematopoetski sustav, može biti indiciran i broj retikulocita i citologija koštane srži iako se te pretrage ne moraju provoditi rutinski.

44. Kliničko-biokemijske pretrage za istraživanje glavnih toksičnih učinaka u tkivima i posebno učinaka na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobivenima od svih pokusnih životinja (deset mužjaka i deset ženki po skupini) u jednakim vremenskim intervalima, kao što je navedeno u hematološkim pretragama. Kod miševa mogu biti potrebne satelitske životinje kako bi se provele sve potrebne kliničko-biokemijske pretrage. Kod studija na neglodavcima uzorci se uzimaju od manjeg broja životinja (npr. četiri životinje po spolu i skupini kod studija na psima), u vrijeme uzorkovanja u međuvremenu te na kraju, kao što je opisano za glodavce. Mjerenja nakon tri mjeseca, bilo u glodavaca ili neglodavaca, ne moraju se

▼M4

provoditi ako na kliničko-biokemijskim parametrima u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivoj visini doze nisu opaženi učinci. Preporučuje se post životinja preko noći (izuzev miševa) prije prikupljanja uzoraka krvi ([1]). Treba ispitati sljedeći popis parametara (38): glukoza, urea (dušična urea), kreatinin, ukupni proteini, albumini, kalcij, natrij, kalij, ukupni kolesterol, najmanje dvije prikladne pretrage za hepatocelularnu ocjenu (alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, glutamat dehidrogenaza, ukupne žučne kiseline) (39) te najmanje dvije prikladne pretrage za hepatobilijarnu ocjenu (alkalna fosfataza, gama glutamil transferaza, 5′-nukleotidaza, ukupni bilirubin, ukupne žučne kiseline) (39). Ostali kliničko-kemijski parametri poput triglicerida tijekom posta, specifičnih hormona i kolinesteraze mogu se mjeriti ako je potrebno, ovisno o toksičnosti ispitivane kemikalije. Općenito gledano, treba primijeniti fleksibilan pristup ovisno o opaženim i/ili očekivanim učincima davane ispitivane kemikalije.

45. Pretrage analize urina treba provesti na svim pokusnim životinjama (deset mužjaka i deset ženki po skupini) na uzorcima skupljenim u jednakim intervalima kao i za hematologiju i kliničku kemiju. Mjerenja nakon tri mjeseca ne moraju se provoditi ako na analizi urina u prethodnoj 90-dnevnoj studiji provedenoj na usporedivoj visini doze nisu opaženi učinci. Sljedeći popis parametara bio je uključen u stručnu preporuku za studije kliničke patologije (38): izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, ukupan broj proteina i glukoza. Ostale pretrage uključuju ketone, urobilinogen, bilirubin i okultnu krv. Ako je potrebno, mogu se upotrijebiti i drugi parametri radi proširenog istraživanja opaženog učinka/opaženih učinaka.

46. Općenito se smatra da osnovne hematološke i kliničko-biokemijske varijable treba odrediti prije tretiranja za studije na psima, ali ih se ne mora odrediti u studijama na glodavcima (38). No, ako su povijesni osnovni podaci (vidjeti stavak 58.) neprikladni, treba se pobrinuti da se ti podaci izrade.

PATOLOGIJA

Makroskopska analiza

47. Sve životinje u studiji moraju se podvrgnuti potpunoj, detaljnoj, makroskopskoj obdukciji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. No, može se odlučiti (kod skupina za usmrćivanje u međuvremenu ili satelitskih skupina) da se mjerenja ograniče na specifične, ključne mjere, poput neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti (vidjeti stavak 21.). Te životinje ne treba podvrgnuti obdukciji i sljedećim postupcima opisanima u stavcima u nastavku. Indikatorske životinje mogu zahtijevati obdukciju u pojedinačnim slučajevima, a odluka je prepuštena voditelju istraživanja.

([1]) Post preko noći preporučuje se za niz mjerenja u serumu i plazmi, a najviše za glukozu. Najvažniji razlog za tu preporuku jest činjenica da bi povećana varijabilnost, koja bi neizbježno nastala kao rezultat izostanka posta, pokazivala sklonost zamagljivanju suptilnih učinaka i otežala tumačenje rezultata. S druge pak strane post preko noći može utjecati na opći metabolizam životinja, a posebno u studijama o hranjenju moglo bi ometati dnevno izlaganje ispitivanoj kemikaliji. Sve životinje treba procjenjivati u istom fiziološkom stanju, a detaljne ili neurološke procjene po mogućnosti treba odrediti za dan kada se ne provodi biokemijsko uzimanje uzoraka.

▼**M4**

48. Treba prikupiti masu organa svih životinja, osim onih isključenih zadnjim dijelom stavka 47. Nadbubrežne žlijezde, mozak, epididimise, srce, bubrege, jetru, jajnike, slezenu, štitnjaču (izvaganu poslije fiksacije, s paraštitnim žlijezdama) i maternicu svih životinja (osim onih pronađenih u stanju ugibanja i/ili usmrćenih u međuvremenu) treba obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva po potrebi te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje.

49. Sljedeća tkiva treba čuvati u najprikladnijem fiksacijskom mediju za oba tipa tkiva i namjeravane histopatološke pretrage koja slijedi (40) (tkiva u uglatim zagradama opcijska su):

sve makroskopske lezije	srce	gušterača	želudac (predželudac, žljezdani želudac)
nadbubrežna žlijezda	ileum	paraštitna žlijezda	[zubi]
aorta	jejunum	periferni živac	testis
mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	bubreg	hipofiza	timus
cekum	suzna žlijezda (eksorbitalna)	prostata	štitnjača
cerviks	jetra	rektum	[jezik]
koagulacijska žiljezda	pluća	žlijezda slinovnica	dušnik
debelo crijevo	limfni čvorovi (površinski i dubinski)	sjemenski mjehurić	mokraćni mjehur
dvanaesnik	mliječna žlijezda (obvezno za ženke i ako se mogu secirati, od mužjaka)	skeletni mišić	maternica (uključujući cerviks)
epididimis	[gornji respiratorni trakt uključujući nos, turbinate i paranazalne sinuse]	koža	[mokraćovod]
oko (uključujući mrežnicu)	jednjak	kralježnica (na tri razine: vratna, srednja prsna i slabinska)	[mokraćna cijev]
[femur sa zglobom]	[olfaktorni bulbus]	slezena	vagina
žučni mjehur (za vrste drukčije od štakora)	jajnik	[prsna kost],	sekcija koštane srži i/ili aspirat svježe koštane srži
Harderova žlijezda			

▼M4

U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba sačuvati oba organa. Klinički i drugi nalazi mogu sugerirati potrebu za pregledom dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve one organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni. U studijama koje uključuju dermalni način primjene treba ispitati popis organa sastavljen za oralni način primjene, s tim da je nužno specifično uzorkovanje i čuvanje kože s mjesta primjene. U studijama inhalacijom popis sačuvanih i ispitanih tkiva iz respiratornog trakta treba slijediti preporuke Poglavlja B.8 ovog Priloga (9) i Poglavlja B.29 ovog Priloga (10). Za ostale organe/tkiva (te uz posebno sačuvana tkiva iz respiratornog trakta) treba ispitati popis organa zadan za oralni način primjene.

Histopatologija

50. Dostupna je smjernica za najbolju praksu u provođenju istraživanja toksikološke patologije (40). Minimalne histopatološke pretrage moraju uključivati:

— sva tkiva iz skupine izložene visokoj dozi i kontrolne skupine,

— sva tkiva životinja uginulih ili usmrćenih tijekom studije,

— sva tkiva s makroskopskim anomalijama,

— tkiva mete ili tkiva koja pokazuju promjene povezane s tretiranjem u skupini izloženoj visokoj dozi, od svih životinja u svih drugim skupinama doza,

— u slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba ispitati oba organa.

OPAŽANJA (FAZA KARCINOGENOSTI)

51. Sve životinje treba pregledati radi bolježljivosti ili ugibanja, obično na početku i kraju svakog dana uključujući vikend i praznike. Životinje treba dodatno provjeravati jedanput dnevno radi specifičnih znakova od toksikološke važnosti. U slučaju studije uz primjenu sonde životinje treba provjeravati u razdoblju odmah nakon doziranja. Posebnu pažnju valja obratiti na razvoj tumora, te treba zabilježiti vrijeme nastanka tumora, lokaciju, dimenzije, izgled i napredovanje svakog makroskopski vidljivog ili palpabilnog tumora.

52. Sve životinje treba izvagati na početka tretiranja, najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Mjerenja unosa i učinkovitosti hrane treba provoditi najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno. Unos vode treba mjeriti najmanje jedanput tjedno u prvih 13 tjedana te zatim barem jedanput mjesečno ako se kemikalija primjenjuje preko vode za piće. Mjerenje unosa vode treba također uzeti u obzir i za studije u kojima se mijenja aktivnost pijenja.

▼M4

Hematologija, klinička biokemija i druga mjerenja

53. Kako bi se na maksimum povećala količina informacija dobivenih iz studija, posebno za način djelovanja, mogu se uzeti uzorci krvi za hematologiju i kliničku biokemiju, o čemu odlučuje voditelj istraživanja. Također može biti prikladna i analiza urina. Podaci o životinjama upotrijebljenima u fazi kronične toksičnosti studije, obično u trajanju od 12 mjeseci (stavak 34.) pružit će informacije o tim parametrima. Ostale upute o vrijednosti uzimanja tih uzoraka kao dio studije karcinogenosti nalaze se u Smjernici br. 116. (7). Ako se uzimaju uzorci krvi, treba ih prikupiti na kraju razdoblja ispitivanja, neposredno prije ili kao dio postupka usmrćivanja životinja. Treba ih uzimati iz određenog mjesta, primjerice punkcijom srca ili iz retroorbitalnog sinusa, pod anestezijom. Razmazi krvi također se mogu pripremiti za pretrage, posebno ako se čini da je organ meta koštana srž, iako se propituje vrijednosti takvih pretraga razmaza krvi u fazi karcinogenosti za određivanje karcinogenog/onkogenog potencijala (38).

PATOLOGIJA

Makroskopska analiza

54. Sve životinje u studiji, osim indikatorskih životinja ili drugih satelitskih životinja (vidjeti stavak 20.), moraju se podvrgnuti potpunoj, detaljnoj makroskopskoj obdukciji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. Indikatorske životinje mogu zahtijevati obdukciju u pojedinačnim slučajevima, a odluka je prepuštena voditelju istraživanja. Mase organa nisu uobičajeni dio studije karcinogeneze budući da gerijatrijske promjene te, u kasnijim fazama, razvoj tumora remete korisnost podataka o masi organa. No mogu biti ključne pri provođenju ocjene težine dokaza te posebno za razmatranje o načinu djelovanja. Ako su dio satelitske studije, treba ih skupiti ne kasnije od godine dana nakon početka studije.

55. Sljedeća tkiva treba čuvati u najprikladnijem fiksacijskom mediju za oba tipa tkiva i namjeravane histopatološke pretrage koja slijedi (40) (tkiva u uglatim zagradama opcijska su):

sve makroskopske lezije	srce	gušterača	želudac (predželudac, žljezdani želudac)
nadbubrežna žlijezda	ileum	paraštitna žlijezda	[zubi]
aorta	jejunum	periferni živac	testis
mozak (uključujući sekcije velikog i malog mozga te medule/mosta)	bubreg	hipofiza	timus
cekum	suzna žlijezda (eksorbitalna)	prostata	štitnjača
cerviks	jetra	rektum	[jezik]
koagulacijska žiljezda	pluća	žlijezda slinovnica	dušnik
debelo crijevo	limfni čvorovi (površinski i dubinski)	sjemenski mjehurić	mokraćni mjehur

▼M4

dvanaesnik	mliječna žlijezda (obvezno za ženke i ako se mogu secirati, od mužjaka)	skeletni mišić	maternica (uključujući cerviks)
epididimis	[gornji respiratorni trakt uključujući nos, turbinate i paranazalne sinuse]	koža	[mokraćovod]
oko (uključujući mrežnicu)	jednjak	kralježnica (na tri razine: vratna, srednja prsna i slabinska)	[mokraćna cijev]
[femur sa zglobom]	[olfaktorni bulbus]	slezena	vagina
žučni mjehur (za vrste drukčije od štakora)	jajnik	[prsna kost],	sekcija koštane srži i/ili aspirat svježe koštane srži
Harderova žlijezda			

U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba sačuvati oba organa. Klinički i drugi nalazi mogu sugerirati potrebu za pregledom dodatnih tkiva. Treba također sačuvati sve organe za koje se smatra da bi mogli biti meta na temelju poznatih svojstava ispitivane kemikalije. U studijama koje uključuju dermalni način primjene treba ispitati popis organa sastavljen za oralni način primjene, s tim da je nužno specifično uzorkovanje i čuvanje kože s mjesta primjene. U studijama inhalacijom popis sačuvanih i ispitanih tkiva iz respiratornog trakta treba slijediti preporuke Poglavlja B.8 ovog Priloga (8) i Poglavlja B.29 ovog Priloga (9). Za ostale organe/tkiva (te uz posebno sačuvana tkiva iz respiratornog trakta) treba ispitati popis organa zadan za oralni način primjene.

Histopatologija

56. Dostupna je smjernica za najbolju praksu u provođenju istraživanja toksikološke patologije (40). Minimum tkiva na kojima su obavljene pretrage mora uključivati:

— Sva tkiva iz skupina izloženih visokoj dozi i kontrolnih skupina,

— Sva tkiva životinja uginulih ili usmrćenih tijekom studije,

— Sva tkiva s makroskopskim anomalijama uključujući tumore,

— Ako se u skupini izloženoj visokoj dozi opaze histopatološke promjene povezane s tretmanom, ta tkiva treba analizirati na svim životinjama u svim skupinama izloženima drugim dozama,

— U slučaju organa u paru, npr. bubrega, nadbubrežnih žlijezda, treba ispitati oba organa.

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE (KARCINOGENOST I KRONIČNA TOKSIČNOST)

Podaci

57. Treba pružiti pojedinačne podatke o životinjama za sve ocijenjene parametre. Uz to sve podatke treba skupiti u obliku tablice, prikazujući za svaku ispitnu skupinu broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga te vrijeme smrti ili usmrćivanja, broj uočenih znakova toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme nastupanja, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog učinka, broj životinja s lezijama, tip lezija te postotak životinja sa svakim tipom lezije. Tablice sa sažetkom podataka trebaju pružiti prosječne i standardne devijacije (za podatke trajnih ispitivanja) za životinje koje pokazuju toksične učinke ili lezije uz stupnjevanje lezija.

58. U tumačenju rezultata studije, npr. u slučaju kada postoje indikacije da su podaci dobiveni u paralelnim kontrolama bitno izvan granica u usporedbi sa skorašnjim podacima dobivenim od kontrolnih životinja iz istog ispitnog smještaja/kolonije, mogu biti dragocjeni povijesni kontrolni podaci. Povijesne kontrolne podatke, ako se ocjenjuju, treba uzeti iz istog laboratorija i povezati sa životinjama iste dobi i soja proizvedenih tijekom pet godina prije dotične studije.

59. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti prikladnom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode i podatke koji će se analizirati treba odabrati tijekom planiranja studije (stavak 9.). Ako je potrebno, odabir treba osigurati prilagodbu radi preživljavanja.

60. U izvješću o ispitivanju treba navesti sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalna narav, čistoća i fizikalno-kemijska svojstva,

— identifikacijski podaci,

— podrijetlo kemikalije,

— broj serije,

— potvrda kemijske analize.

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje odabira nosača (ako nije voda).

Pokusne životinje:

— korištene vrste/sojevi te obrazloženje odabira,

— broj, dob i spol životinja na početku ispitivanja,

— podrijetlo, uvjeti držanja, prehrana itd.,

— pojedinačne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja.

▼**M4**

Uvjeti ispitivanja:

— argumentacija za način primjene i odabir doze,

— ako je primjenjivo, statistička metoda korištena za analizu podataka,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije/hrane,

— analitički podaci o postignutoj koncentraciji, stabilnosti i homogenosti preparata,

— način primjene i pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— za studije inhalacijom, bilo samo nosom ili čitavim tijelom,

— stvarne doze (mg/kg tjelesne mase po danu) i faktor pretvorbe iz koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (mg/kg ili ppm) sa stvarnom dozom ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Rezultati (treba prikazati tablično sažete podatke i pojedinačne podatke za životinje):

Općenito

— Podaci o preživljavanju,

— Tjelesna masa/promjene u tjelesnoj masi,

— Unos hrane, izračun učinkovitosti hrane ako je napravljen te unos vode ako je primjenjivo,

— Toksikokinetički podaci ako su raspoloživi,

— Oftalmoloskopija (ako je raspoloživa)

— Hematologija (ako je raspoloživa)

— Klinička kemija (ako je raspoloživa)

Klinički nalazi

— Znakovi toksičnosti,

— Učestalost (te, ako je zabilježena, ozbiljnost) svih anomalija,

— Narav, ozbiljnost i trajanje kliničkih opažanja (prolaznih ili trajnih),

Obdukcijski podaci

— Tjelesna masa na kraju,

— Mase organa i njihovi omjeri ako je primjenjivo,

— Nalazi obdukcije, Učestalost i ozbiljnost anomalija.

Histopatologija

— Neneoplastični histopatološki nalazi,

— Neoplastični histopatološki nalazi,

▼**M4**

— Međusobni odnos između makroskopskih i mikroskopskih nalaza

— Detaljan opis svih histopatoloških nalaza povezanih s tretiranjem, uključujući stupnjeve ozbiljnosti,

— Izvješće svih pregleda objektnih stakalaca mikroskopa provedenih od kolega

Statistička obrada rezultata po potrebi

Rasprava o rezultatima uključujući:

— Rasprava o svim modelima pristupa

— Odnosi doza i reakcija

— Povijesni kontrolni podaci

— Razmatranja o svim načinima djelovanja informacija

— Određivanje BMD, NOAEL ili LOAEL

— Relevantnost za ljude

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (1995.). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

6. Poglavlje B.27 ovog Priloga, Studija subkronične oralne toksičnosti - 90-dnevna studija oralne toksičnosti na neglodavcima uz primjenu ponavljanih doza.

7. OECD (2012.). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

9. Poglavlje B.8 ovog Priloga. Subakutna inhalacijska toksičnost: 28-dnevna studija.

10. Poglavlje B.29 ovog Priloga, Subkronična inhalacijska toksičnost: 90-dnevna studija.

11. Poglavlje B.9 ovog Priloga, Toksičnost (dermalna) pri ponavljanoj dozi (28 dana).

▼M4

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

20. OECD (2002.). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

21. OECD (2000.). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

27. Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se upotrebljavaju u znanstvene svrhe, SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

34. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

35. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

36. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

37. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

38. Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

39. EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *i sur.* (2004). Smjernica za najbolju praksu: Toksikološka histopatologija, Toksikološka patologija 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼B

B.34. **TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA JEDNOJ GENERACIJI**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema ih.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar primjenjuje se u graduiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Mužjacima se doza daje tijekom rasta i tijekom najmanje jednog punog ciklusa spermatogeneze (približno 56 dana kod miševa i 70 dana kod štakora) kako bi izazvala štetne učinke ispitivane tvari na spermatogenezu.

Ženkama roditeljske generacije (P) dozu tvari treba davati najmanje tijekom puna dva ciklusa estrusa kako bi se izazvali štetni učinci ispitivane tvari na estrus. Nakon tog životinje se pare. U razdoblju parenja ispitivana tvar daje se i mužjacima i ženkama, a zatim samo ženkama dok su skotne i u razdoblju dojenja. Za primjenu ispitivane tvari inhalacijom ovu će metodu trebati modificirati.

1.5. KRITERIJI KVALITETE

Nema ih.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. *Pripreme*

Prije ispitivanja, zdrave mlade odrasle životinje biraju se nasumice i raspodjeljuju u skupine za tretiranje i kontrolne skupine. Životinje treba smjestiti i hraniti u uvjetima pokusa najmanje pet dana pred ispitivanje. Preporuča se ispitivanu tvar davati u hrani ili vodi za piće. Prihvatljivi su i drugi putevi primjene. U odgovarajućem pokusnom razdoblju svim životinjama doze se moraju davati na isti način. Ako se, radi jednostavnije primjene, koristi neki nosač ili drugi aditivi, za njih se mora znati da ne proizvode toksične učinke. Doze se daju sedam dana u tjednu.

▼B

1.6.2. *Pokusne životinje*

Odabir vrsta

Poželjne vrste su štakori ili miševi. Treba koristiti zdrave životinje koje prethodno nisu sudjelovale u pokusima. Sojeve slabe plodnosti ne bi trebalo koristiti. Ispitne životinje treba okarakterizirati u pogledu vrste, soja, spola, mase i/ili dobi.

Za primjerenu procjenu plodnosti, istraživanjem treba obuhvatiti i mužjake i ženke. Sve životinje iz ispitnih i kontrolnih skupina trebaju biti odbijene od sise prije nego što započne primjena doza.

Broj i spol

Svaka tretirana i kontrolna skupina treba sadržavati dovoljan broj životinja kako bi se dobilo oko 20 ženki koje su skotne ili pred okot.

Cilj je dobiti dovoljno skotnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala tvari da utječe na plodnost, skotnost i majčinsko ponašanje životinja generacije P te na sisanje, rast i razvoj potomstva F_1 od začeća do odbijanja od sise.

1.6.3. *Uvjeti ispitivanja*

Hranu i vodu treba osigurati *ad libitum*. Pred parturiciju, skotne ženke treba smjestiti u posebne kaveze za okot ili materinstvo, te im po potrebi treba osigurati materijale za izradu gnijezda.

1.6.3.1. Visine doza

Treba koristiti najmanje tri tretirane skupine i jednu kontrolnu skupinu. Ako se kod primjene ispitivane tvari koristi neki nosač, kontrolna skupina treba primiti taj nosač u najvećoj količini koja je primijenjena. Ako ispitivana tvar uzrokuje smanjenje unosa ili iskorištenja hrane, treba razmotriti eventualnu potrebu uvođenja kontrolne skupine koja će biti hranjena na isti način. U idealnom slučaju, ako nije ograničena fizikalnim/kemijskim prirodnim svojstvima ili biološkim učincima ispitivane tvari, doza bi trebala biti takve visine koja će dovesti do toksičnosti, ali ne i do smrtnosti roditeljskih životinja (P). Srednja doza ili doze trebale bi uzrokovati minimalne toksične učinke koji se mogu pripisati ispitivanoj tvari, a male doze ne bi trebale dovesti ni do kakvih zamjetnih štetnih učinaka na roditelje ili na potomstvo. Kod primjene pomoću želučane sonde ili u kapsulama, dozu koja se daje svakoj životinji treba temeljiti na masi tijela pojedine životinje i prilagođavati tjedno prema promjenama u masi tijela. Za skotne ženke, doziranje se može temeljiti na masi tijela na dan graviditeta 0 ili 6, po želji.

1.6.3.2. Granični test

Kad se radi o tvarima niske toksičnosti, ako se visinom doze od najmanje 1 000 mg/kilogramu ne dokaže utjecaj na reproduktivnu sposobnost, može se smatrati da ispitivanja s drugim visinama doza nisu potrebna. Ako istraživanje s primjenom velike doze i definitivnim dokazom toksičnosti na majci ne pokazuje štetne učinke na plodnost, može se smatrati kako istraživanja s drugim dozama nisu potrebna.

▼B

1.6.3.3. *Provođenje ispitivanja*

Plan pokusa

Dnevnu primjenu doza kod roditeljskih mužjaka (P) treba početi u dobi od pet do devet tjedana, nakon što su odbijeni od sise i nakon minimalno petodnevne aklimatizacije. Kod štakora, doziranje se nastavlja tijekom 10 tjedana prije razdoblja parenja (za miševe, osam tjedana). Mužjake treba usmrtiti i pregledati ili na kraju razdoblja parenja ili ih, alternativno, zadržati na ispitnom režimu prehrane kako bi se eventualno dobio drugi okot, pa ih onda, negdje pred kraj istraživanja, usmrtiti i pregledati. Kod roditeljskih ženki (P), s doziranjem treba početi nakon najmanje pet dana aklimatizacije i nastaviti još najmanje dva tjedna pred parenje. Dnevnu primjenu doza kod ženki generacije p treba nastaviti tijekom puna tri tjedna razdoblja parenja, trudnoće i sve do odbijanja potomstva F_1 od sise. Treba razmotriti eventualne izmjene u rasporedu doziranja na temelju drugih dostupnih informacija o ispitivanoj tvari, primjerice indukciji metabolizma ili bioakumulaciji.

Postupak parenja

Za studije reproduktivne toksičnosti može se koristiti parenje bilo 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku) ili 1:2 (jedan mužjak na dvije ženke).

Na temelju parenja 1:1, jedna ženka ostavlja se s istim mužjakom sve dok ne dođe do oplodnje ili do isteka tri tjedna. Svako jutro ženke treba pregledati s obzirom na prisutnost sperme ili vaginalnih čepova. Danom graviditeta 0 smatra se dan kad je nađen vaginalni čep ili sperma.

Parove koji se nisu uspjeli pariti treba pregledati kako bi se utvrdio uzrok očite neplodnosti.

To može obuhvatiti postupke kao što su pružanje dodatne mogućnosti za parenje s drugim mužjacima i ženkama čije je roditeljstvo dokazano, mikroskopski pregled reproduktivnih organa i preispitivanje ciklusa estrusa ili spermatogeneze.

Veličine legla

Životinjama na koje se doze primjenjuju tijekom istraživanja plodnosti dozvoljava se da se normalno okote i da podignu svoje potomstvo do faze odbijanja od sise bez standardizacije legla.

Ako se provodi standardizacija, predlaže se sljedeći postupak. Između 1. i 4. dana nakon okota, veličina svakog legla može se prilagoditi selekcijskim uklanjanjem dodatnih mladunaca na način da se po jednom leglu ostave, po mogućnosti, četiri mužjaka i četiri ženke.

Kad god je broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri mladunca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. pet mužjaka i tri ženke).

▼B

1.6.4. Opažanja

Cijelo razdoblje ispitivanja svaku životinju treba opažati najmanje jednom dnevno. Treba bilježiti značajne promjene ponašanja, znakove otežane ili produžene parturicije i sve znakove toksičnosti, uključujući smrtnost. U razdobljima pred parenje i tijekom parenja, potrošnja hrane može se mjeriti svaki dan. Nakon okota i za vrijeme laktacije, potrošnju hrane (i potrošnju vode ako se ispitivana tvar primjenjuje u vodi za piće) treba mjeriti istog dana kad se obavlja vaganje legla. Mužjake i ženke roditeljske generacije P treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim jednom tjedno. Ta opažanja treba unijeti u izvješće pojedinačno za svaku odraslu životinju.

Vrijeme gestacije treba računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon poroda treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i spol mladunaca, mrtvorođenih, živorođenih i prisutnost velikih anomalija.

Mladunčad koja je mrtvorođena i usmrćena četvrtog dana treba konzervirati i proučiti kako bi se utvrdili eventualni defekti. Živu mladunčad treba prebrojiti i legla izvagati jutro nakon okota te četvrtog i sedmog dana, a zatim jednom tjedno sve do završetka istraživanja, kad životinje treba izvagati pojedinačno.

Uočene fizičke anomalije ili anomalije u ponašanju roditeljskih ženki ili potomaka treba zabilježiti.

1.6.5. Patologij*a*

1.6.5.1. Nekropsija

U vrijeme usmrćenja ili smrti tijekom istraživanja životinje roditeljske generacije P treba pregledati makroskopski radi utvrđivanja eventualnih strukturnih anomalija ili patoloških promjena, s tim da posebnu pozornost treba posvetiti organima reproduktivnog sustava. Mladunčad koja je uginula ili je na umoru treba pregledati kako bi se utvrdile patološke promjene.

1.6.5.2. Histopatologija

Ovarije, uterus, cerviks, vaginu, testise, epididimise, sjemene vezikule, prostatu, prednji režanj prostate, hipofizu i ciljne organe svih roditeljskih životinja P treba konzervirati za mikroskopski pregled. U slučaju da ti organi nisu bili pregledani kod drugih istraživanja s višestrukim dozama, treba ih mikroskopski pregledati po mogućnosti kod svih životinja koje su bile izložene velikim dozama i kontrolnih životinja koje su uginule tijekom istraživanja.

Organe na kojima su kod tih životinjama nađene anomalije zatim treba pregledati kod ostalih roditeljskih životinja P. U takvim slučajevima, mikroskopski treba pregledati sva tkiva kod kojih su utvrđene velike patološke promjene. Kao što je predloženo u stavku o postupcima parenja, reproduktivne organe životinja za koje se sumnja da su neplodne može se podvrgnuti mikroskopskoj pretrazi.

▼B

2. **PODACI**

Podaci se mogu sažeto prikazati u obliku tablice, na način da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku pokusa, broj plodnih mužjaka, broj skotnih ženki, tipovi promjena i postotak životinja kod kojih je pojedina vrsta promjene primijećena.

Kad je to moguće, numeričke podatke treba vrednovati odgovarajućom statističkom metodom. Može se primijeniti bilo koja opće prihvaćena statistička metoda.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati slijedeće informacije:

— vrsta/soj koji je upotrijebljen,

— podaci o toksičkoj reakciji po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sposobnost preživljavanja,

— vrijeme smrti tijekom istraživanja ili jesu li životinje preživjele do trenutka planiranog usmrćenja ili završetka istraživanja,

— tablica koja prikazuje mase svakog legla, srednje mase mladunčadi i pojedinačne mase mladunčadi na završetku istraživanja,

— toksički ili drugi učinci na reprodukciju, potomke i postnatalni rast,

— dan opažanja svakog neuobičajenog znaka i njegov daljnji razvoj,

— podaci o tjelesnoj masi roditeljskih životinja (P),

— nalazi nekropsije,

— detaljan opis svih mikroskopskih nalaza,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi,

— rasprava o rezultatima,

— tumačenje rezultata.

3.2. VREDNOVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

Vidjeti Opći uvod, dio B.

4. **REFERENCE**

Vidjeti Opći uvod, dio B.

▼B

B.35. **STUDIJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA DVIJE GENERACIJE**

1. **METODA**

Ova je metoda replika Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 416 (2001).

1.1. UVOD

Ova metoda za ispitivanje reprodukcije na dvije generacije namijenjena je za dobivanje općenitih informacija o učincima ispitivane tvari na integritet i funkcioniranje muških i ženskih reproduktivnih sustava, uključujući i funkciju spolnih žlijezda, ciklus estrusa, ponašanje kod parenja, začeće, gestaciju, parturiciju, laktaciju i odbijanje od sise, te rast i razvoj potomaka. Ovom studijom može se doći i do informacija o učincima ispitivane tvari na neonatalni morbiditet, mortalitet kao i do preliminarnih podataka o prenatalnoj i postnatalnoj razvojnoj toksičnosti, pa može služiti kao smjernica za daljnja ispitivanja. Osim za istraživanja rasta i razvoja generacije F1, ova je ispitna metoda namijenjena i procjeni integriteta i funkcioniranja muških i ženskih reproduktivnih sustava kao i rasta i razvoja generacije F2. Za dodatne informacije o razvojnoj toksičnosti i funkcionalnim nedostacima u ovaj protokol mogu se ugraditi dodatna istraživanja, te po potrebi konzultirati metode za ispitivanje razvojne toksičnosti i/ili razvojne neurotoksičnosti, ili se te krajne točke mogu proučavati u odvojenim istraživanjima, primjenom odgovarajućih ispitnih metoda.

1.2. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar primjenjuje se u graduiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Mužjacima generacije P doza se daje tijekom rasta i tijekom najmanje jednog punog ciklusa spermatogeneze (približno 56 dana kod miševa i 70 dana kod štakora) kako bi izazvala štetne učinke ispitivane tvari na spermatogenezu. Učinci na spermu određuju se nizom parametara (npr. morfologija i pokretljivost sperme), i na pripravcima tkiva te detaljnom histopatologijom. Ako su podaci o spermatogenezi poznati iz ranijeg dovoljno dugog istraživanja o ponavljanoj primjeni doze, npr. 90–dnevnog istraživanja, procjenom ne treba obuhvatiti mužjake generacije P. Međutim, uzorke ili digitalna očitanja sperme generacije P preporučljivo je spremiti za kasniju procjenu. Ženkama generacije P dozu treba davati tijekom rasta i nekoliko potpunih ciklusa estrusa kako bi se izazvali štetni učinci ispitivane tvari na normalan ciklus estrusa. Ispitivana tvar dozira se roditeljskim životinjama (P) u razdoblju parenja, tijekom nastale trudnoće i za vrijeme dok se njihovo potomstvo F1 odbija od sise. Nakon odbijanja od sise tvar se potomcima F1 nastavlja davati u razdoblju rasta i odrasle dobi, parenja i produkcije generacije F2, sve dok se generacija F2 ne odbije od sise.

Na svim životinjama provode se klinička opažanja i patološka ispitivanja kako bi se utvrdili znakovi toksičnosti s posebnim naglaskom na integritet i funkcioniranje muških i ženskih reproduktivnih sustava kao i rasta i razvoja potomstva.

▼B

1.3. OPIS ISPITNE METODE

1.3.1. **Odabir životinjskih vrsta**

Poželjna vrsta za ispitivanje su štakori. Ako se koriste druge vrste, opravdanost toga treba dokazati, a bit će potrebne i primjerene modifikacije. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Na početku studije, odstupanje mase životinja koje se koriste treba biti minimalno, odnosno ne veće od 20 % srednje mase za svaki spol.

1.3.2. **Uvjeti smještaja i prehrane**

Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće. Na izbor hrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina s ispitivanom tvari koja se daje u hrani.

Životinje se mogu smjestiti odvojeno ili držati u kavezima u malim skupinama istog spola. Postupci parenja trebaju se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Nakon što je očito da je došlo do kopulacije, u kaveze za okot ili potomstvo skotne ženke treba smjestiti same. Štakori se nakon parenja mogu držati u malim skupinama, pa ih onda dan ili dva prije parturicije treba odvojiti. Pred termin parturicije skotnim životinjama treba osigurati odgovarajući i utvrđeni materijal za pravljenje gnijezda.

1.3.3. **Priprema životinja**

Treba koristiti zdrave mlade životinje koje su najmanje pet dana prilagođavane laboratorijskim uvjetima i koje ranije nisu podvrgavane pokusnim postupcima. Pokusne životinje treba okarakterizirati u pogledu vrste, soja, spola, mase i/ili starosti. Eventualno srodstvo između životinja treba biti poznato kako bi se izbjeglo parenje srodnika. Životinje se nasumice biraju i raspodjeljuju u kontrolnu skupinu i skupinu koja će se tretirati (preporuča se regrupiranje prema masi tijela). Kaveze treba rasporediti na način da se maksimalno umanje mogući učinci boravka u kavezu. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj. Za generaciju P, to treba učiniti prije početka doziranja. Za generaciju F1, to treba učiniti u trenutku kad se životinje odabrane za parenje odbiju od sise. Za sve odabrane životinje F1 treba voditi evidenciju o početnom leglu. Osim toga, za potrebe pojedinačnog vaganja mladunaca ili provođenja bilo kojeg funkcionalnog ispitivanja preporuča se pojedinačna identifikacija mladunčadi odmah nakon rođenja.

Prije početka doziranja roditeljske životinje (P) moraju biti stare oko pet do devet tjedana. Životinje u svim ispitnim skupinama po mogućnosti trebaju biti podjednake mase i starosti.

▼B

1.4. POSTUPAK

1.4.1. **Broj i spol životinja**

Svaka ispitna i kontrolna skupina treba sadržavati dovoljan broj životinja kako bi se dobio poželjan broj od najmanje 20 ženki koje su skotne ili pred okot. Kod tretiranja tvarima koje uzrokuju neželjene učinke (npr. sterilnost, prekomjernu toksičnost kod velike doze), to možda neće biti moguće. Cilj je proizvesti dovoljno skotnih ženki kako bi se osigurala valjana procjena potencijala tvari da utječe na plodnost, trudnoću i majčinsko ponašanje, te na sisanje, rast i razvoj potomstva F_1 od začeća do odbijanja od sise, i na razvoj potomstva (F2) do odbijanja od sise. Stoga nepostizanje željenog broja skotnih životinja (tj. 20) ne znači nužno da istraživanje nije neuspjelo, već procjenu treba provoditi od slučaja do slučaja.

1.4.2. **Priprema doza**

Preporuča se ispitivanu tvar davati oralno (u hrani, vodi za piće ili sondom) ako se neki drugi način primjene (npr. dermalno ili inhalacijom) ne smatra prikladnijim.

Prema potrebi, ispitivana tvar se otapa ili suspendira u odgovarajućem otapalu ili nosaču. Preporuča se, kad god je to moguće, prvo razmotriti upotrebu vodene otopine/suspenzije, pa onda otopinu/emulziju u ulju (npr. kukuruzno ulje) i na kraju eventualnu otopinu u drugim otapalima. Za sve druge nosače osim vode treba poznavati toksičke karakteristike nosača. Stabilnost ispitivane tvari u pomoćnoj tvari treba odrediti.

1.4.3. **Doziranje**

Treba koristiti najmanje tri jačine doze i istodobno jednu kontrolnu. Ako nije ograničena fizikalno–kemijskim svojstvima ili biološkim učincima ispitivane tvari, najjaču dozu treba odabrati s ciljem da se izazove toksičnost, a ne smrt ili teška patnja. U slučaju neočekivane smrtnosti, studije sa stopom smrtnosti manjom od oko 10 % kod roditeljskih životinja (P) obično se još smatraju prihvatljivima. Treba odabrati slijed postepenog smanjivanja doze koji će ukazati na sve učinke određenih doza i visine kod kojih se ne opažaju štetni učinci (NOAEL vrijednosti). Za utvrđivanje visine sve slabijih doza često je optimalno doze primijeniti u dva do tri intervala, a može biti bolje dodati i četvrtu ispitnu skupinu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10). U svrhu prehrambenih istraživanja interval doziranja ne bi smio biti veći od faktora tri. Visinu doze treba odabrati imajući u vidu postojeće podatke o toksičnosti, posebno rezultate istraživanja s ponavljanim dozama. Treba uzeti u obzir sve dostupne informacije o metabolizmu i kinetici ispitivanog spoja ili s njim povezanih materijala. Tim će se informacijama moći opravdati i prikladnost režima doziranja.

▼B

Kontrolna skupina je netretirana skupina ili kontrolna skupina za nosač ako se za davanje ispitivane tvari nosač koristi. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u ispitnoj skupini. Ako se koristi nosač, kontrolna skupina taj nosač mora primiti u najvećem volumenu koji je upotrijebljen. Ako se ispitivana tvar daje pomiješana s hranom, a uzrokuje smanjeni unos ili iskorištenje hrane, može se smatrati potrebnim uvođenje paralelne kontrolne skupine za prehranu. Alternativno, umjesto takve paralelno hranjene kontrolne skupine mogu se upotrijebiti podaci iz kontrolnih studija koje su provedene s ciljem procjene učinaka smanjene potrošnje hrane na reproduktivne parametre.

Treba uzeti u obzir sljedeće karakteristike nosača i drugih aditiva: učinci na apsorpciju, distribuciju, metabolizam, ili zadržavanje ispitivane tvari; učinci na kemijska svojstva ispitivane tvari koji mogu izmijeniti njezine toksičke karakteristike; i učinci na potrošnju hrane ili vode ili nutritivno stanje životinja.

1.4.4. **Granični test**

Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan, ili kod davanja doze u hrani ili vodi za piće, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje u hrani ili vodi za piće u skladu s postupcima opisanim u ovoj studiji, ne proizvede uočljive toksičke učinke niti kod roditeljskih životinja niti njihovih potomaka, i ako na temelju podataka iz strukturno i/ili metabolički srodnih spojeva ne treba očekivati toksičnost, u takvim slučajevima može se smatrati da provođenje potpune studije s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični je test relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće oralne doze. Za druge puteve primjene doza, kao što su udisanje ili primjena putem kože, fizikalno–kemijska svojstva ispitivane tvari, npr. topljivost, često mogu određivati i ograničavati najvišu moguću razinu izlaganja koja se smije postići.

1.4.5. **Primjena doza**

Životinjama treba davati doze ispitivane tvari 7 dana u tjednu. Poželjna je oralna primjena (u hrani, vodi za piće, ili želučanom sondom). Ako se koristi drugi put primjene, za to treba navesti opravdane razloge, a mogu biti potrebne i odgovarajuće modifikacije. U odgovarajućem razdoblju pokusa svim se životinjama doze moraju davati istom metodom. Ako se ispitivana tvar daje na sondu, to treba učiniti primjenom želučane sonde. Volumen tekućine koja se daje odjednom ne smije prijeći 1 ml/100 g tjelesne mase (0,4 ml/100 g tjelesne mase je maksimum za kukuruzno ulje), osim u slučaju vodenih otopina kod kojih se smije koristiti 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim kod nadražujućih i nagrizajućih tvari, za koje je normalno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena treba podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod svih visina doze osigurao stalni volumen. Kod studija u kojima se primjenjuje hranjenje na sondu, mladunci će, naravno, ispitnu tvar primati samo posredno, u mlijeku, sve dok za njih ne započne izravno doziranje nakon odbijanja od sise. Kod studija u kojima se tvar daje u hrani ili vodi za piće, mladunci će dodatno primati ispitivanu tvar izravno kad sami počnu jesti tijekom posljednjeg tjedna razdoblja laktacije.

▼B

Za tvari koje se daju u hrani ili vodi za piće, važno je osigurati da količine ispitivane tvari o kojoj se radi nemaju utjecaja na uobičajen unos hrane ili vode. Ako se ispitivana tvar daje u hrani, može se koristiti stalna koncentracija u hrani (ppm) ili stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje; treba navesti koja se od te dvije mogućnosti koristi. Za tvar koja se daje na sondu, dozu treba davati u podjednako vrijeme svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Kod prilagođavanja doze koja se daje na sondu, a temelji se na masi, treba uzeti u obzir informacije o difuziji kroz posteljicu.

1.4.6. **Plan pokusa**

Dnevna primjena doza kod roditeljskih mužjaka i ženki (P) treba početi kad su stari pet do devet tjedana. Dnevno davanje doze kod mužjaka i ženki F1 počinje nakon što su odbijeni od sise; treba imati na umu da je u slučajevima kad se ispitivana tvar daje u hrani ili vodi za piće, do izravnog izlaganja mladunaca F1 ispitivanoj tvari već došlo tijekom razdoblja laktacije. Za oba spola (P i F1), doziranje se nastavlja do najmanje 10 tjedana prije razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom dvotjednog razdoblja parenja. Kad više nisu potrebni za procjenu reproduktivnih učinaka, mužjake treba humano usmrtiti i pregledati. Za roditeljske ženke (P), doziranje se nastavlja cijelo vrijeme graviditeta i sve do odbijanja od sise potomaka F1. Na temelju dostupnih informacija o ispitivanoj tvari, uključujući postojeće podatke o toksičnosti, indukciji metabolizma ili bioakumulaciji, treba razmotriti eventualne izmjene u rasporedu doziranja. Doza za svaku životinju svakako se mora temeljiti na najnovijem određivanju pojedinačne tjelesne mase. Međutim, kod prilagođavanja doze u tijeku posljednjeg tromjesečja graviditeta potreban je oprez.

Tretiranje mužjaka i ženki P i F1 nastavlja se do kraja studije. Kad više nisu potrebni za procjenu učinaka na reprodukciju, sve odrasle mužjake i ženke P i F1 treba humano usmrtiti. Potomke F1 koji nisu izabrani za parenje i sve potomke F2 treba humano usmrtiti nakon što su odbijeni od sise.

1.4.7. **Postupak parenja**

1.4.7.1. *Parenje roditeljske generacije (P)*

Za svako parenje svaku se ženku stavi s jednim mužjakom iz istog ranga visine doze (parenje 1:1) sve dok ne dođe do kopulacije ili do isteka dva tjedna. Svakog dana ženke treba pregledati s obzirom na prisutnost sperme ili vaginalnih čepova. Danom graviditeta 0 smatra se dan kad je nađen vaginalni čep ili sperma. Ako je parenje neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste skupine. Parove koji se pare treba jasno identificirati u podacima. Parenje srodnika treba izbjegavati.

▼B

1.4.7.2. *Parenje generacije F1*

Za parenje potomaka F1, u trenutku odbijanja od sise iz svakog legla treba odabrati najmanje jednog mužjaka i jednu ženku za parenje s drugim mladuncima tretiranim istom visinom doze, ali iz različitog legla, kako bi se dobila generacija F2. Ako u tjelesnoj masi ili izgledu muških mladunaca u leglu nema znatnih razlika, odabir mladunaca iz svakog legla treba provesti nasumice. Ako se te razlike opažaju, iz svakog legla treba odabrati najbolje predstavnike. To je najbolje provesti na temelju tjelesne mase iako je možda prikladnije na temelju izgleda. Potomke F1 ne treba pariti dok ne postignu punu spolnu zrelost.

Parove koji se nisu uspjeli pariti treba pregledati kako bi se utvrdio uzrok očite neplodnosti. To može obuhvatiti postupke kao što su pružanje dodatne mogućnosti za parenje s drugim mužjacima i ženkama čije je roditeljstvo dokazano, mikroskopski pregled reproduktivnih organa te preispitivanje ciklusa estrusa ili spermatogeneze.

1.4.7.3. *Drugo parenje*

U nekim slučajevima, primjerice kad su zbog tretiranja u prvom parenju učinjene određene promjene u veličini legla ili je opažen dvosmislen učinak, preporuča se ponovno parenje odraslih životinja P ili F1 kako bi se dobilo drugo leglo. Preporuča se ženke ili mužjake koji nisu dali leglo ponovno pariti s dokazanom rasplodnom životinjom suprotnog spola. Ako se proizvodnja drugog legla u bilo kojoj generaciji smatra neophodnom, životinje treba pariti približno tjedan dana nakon odbijanja od sise prvog legla.

1.4.7.4. *Veličina legla*

Životinjama se dozvoljava da se normalno okote i da podignu svoje potomstvo do faze odbijanja od sise. Standardizacija veličine legla nije obvezna. Kad se standardizacija poduzima, metodu koja se rabi treba iscrpno opisati.

1.5. OPAŽANJA

1.5.1. **Klinička opažanja**

Opća klinička opažanja treba provoditi svakog dana, a u slučaju davanja doze putem sonde, kod određivanja u koje će se vrijeme opažanje obavljati treba uzeti u obzir vrijeme u koje se predviđa da će učinci imati maksimalnu jačinu nakon doziranja. Promjene ponašanja, znakove otežane ili produžene parturicije i sve znakove toksičnosti treba bilježiti. Uz to, svaku životinju treba detaljnije pregledati najmanje jednom tjedno, što je prikladno učiniti kod vaganja životinja. Dvaput dnevno, i ako je primjereno jednom dnevno tijekom vikenda, sve životinje treba opažati s obzirom na morbiditet i mortalitet.

▼B

1.5.2. **Tjelesna masa i potrošnja vode/hrane roditeljskih životinja**

Roditeljske životinje (P i F1) važu se prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno. Roditeljske ženke (P i F1) treba vagati najmanje 0., 7., 14. i 20. ili 21. dana gestacije i tijekom laktacije na iste dane na koje se obavlja vaganje legla i na dan kad se životinje usmrćuju. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno. Za vrijeme razdoblja pred parenje i tijekom gestacije potrošnju hrane treba mjeriti najmanje jednom tjedno. Ako se ispitivana tvar daje u vodi, potrošnju vode treba mjeriti najmanje jednom tjedno.

1.5.3. **Ciklus estrusa**

Duljina i normalno odvijanje ciklusa estrusa procjenjuje se kod ženki P i F1 na temelju vaginalnog brisa prije parenja, i neobvezno tijekom parenja, sve dok se ne dokaže da je došlo do parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza, i kasnije, ne izazove lažna trudnoća (1).

1.5.4. **Parametri sperme**

Po završetku studije, za sve mužjake generacija P i F1 bilježi se masa testisa i epididimisa, i po jedan organ od svakog čuva se za histopatološki pregled (vidjeti odjeljak 1.5.7., 1.5.8.1.). Preostali testisi i epididimisi podskupine od najmanje 10 mužjaka iz svake skupine mužjaka generacija P i F1, koriste se kako bi se pobrojali spermatidi otporni na homogenizaciju, odnosno zalihe sperme iz repa epididimisa. Za tu istu podskupinu mužjaka treba sakupiti zalihu sperme iz repa epididimisa ili sjemenovoda za procjenu pokretljivosti i morfologije sperme. Ako se opaze učinci povezani s tretiranjem ili na temelju drugih studija u kojima su dokazani mogući učinci na spermatogenezu, procjenu sperme treba provesti na svim mužjacima u svakoj tretiranoj skupini; u protivnom brojanje se može ograničiti na mužjake generacija P i F1 iz kontrolne skupine i skupine izložene velikim dozama.

Treba pobrojati ukupan broj spermatida iz testisa koji su otporni na homogenizaciju, odnosno iz zalihe sperme iz repa epididimisa (2)(3). Zalihe sperme iz repa epididimisa mogu se izračunati iz koncentracije i volumena sperme u suspenziji koja se rabi za kvalitativne procjene, a broj rekuperirane sperme naknadnim seciranjem i/ili homogenizacijom preostalog tkiva repića. Brojanje se provodi na odabranoj podskupini mužjaka iz svih tretiranih skupina odmah nakon što su životinje usmrćene, ako se ne provodi video ili digitalno snimanje ili ako se uzorci ne zamrzavaju za kasniju analizu. U tim slučajevima, prvo se mogu analizirati kontrolna skupina i skupina izložena velikim dozama. Ako nema vidljivih učinaka tretiranja (npr. učinaka na broj, pokretljivost ili morfologiju sperme), druge skupine ne treba analizirati. Ako su učinci koji se javljaju kao posljedica tretiranja zabilježeni u skupini izloženoj velikim dozama, treba procijeniti i skupine koje su primale manje doze.

▼B

Pokretljivost sperme iz epididimisa (ili iz *ductus deferens*) treba procijeniti ili snimiti video snimkom odmah nakon što je životinja usmrćena. Spermu treba izvaditi uz minimalna oštećenja i razrijediti za analizu pokretljivosti primjenjujući prihvatljive metode (4). Postotak progresivno pokretljive sperme treba odrediti subjektivno ili objektivno. Ako se analiza pokretljivosti radi pomoću računala (5)(6)(7)(8)(9)(10), progresivna pokretljivost vrednuje se prema graničnim vrijednostima koje odredi korisnik za prosječnu brzinu puta i pravocrtnost ili indeks linearnosti. Ako se kod nekropsije uzorci snimaju video kamerom (11) ili na drugi način slikaju, naknadnom analizom mogu se obuhvatiti samo mužjaci generacija P i F1 iz kontrolne skupine i skupine izložene velikim dozama, osim ako se ne opažaju učinci uzrokovani tretiranjem; u tom slučaju, skupine s nižim dozama također treba procijeniti. U nedostatku video ili digitalnog zapisa, kod nekropsije treba analizirati sve uzorke u svim tretiranim skupinama.

Potrebno je izvršiti procjenu morfologije sperme iz epididimisa (ili iz *vas deferens*). Spermu (najmanje 200 spermatozoida po uzorku) treba pregledati kao fiksirane mokre pripravke (12) i klasificirati je kao normalnu ili ne. Primjeri morfoloških anomalija spermatozoida obuhvaćaju fuziju, odvojene glave i deformirane glave i/ili repove. Procjenu treba provesti na odabranoj podskupini mužjaka iz svih skupina različitih visina doze odmah nakon usmrćenja životinja ili kasnije, na temelju video ili digitalnog zapisa. Brisove, koji se jednom fiksiraju, moguće je očitavati i kasnije. U tim slučajevima, prvo se mogu analizirati kontrolna skupina i skupina izložena velikim dozama. Ako nema vidljivih učinaka tretiranja (npr. učinaka na morfologiju sperme), druge tretirane skupine ne treba analizirati. Ako su učinci koji se javljaju kao posljedica tretiranja zabilježeni u skupini izloženoj velikim dozama, treba procijeniti i skupine koje su primale manje doze.

Ako je bilo koji od gore spomenutih parametara za procjenu sperme već ranije bio ispitan u okviru sustavne studije toksičnosti u trajanju od najmanje 90 dana, nije ga nužno ponavljati u ovom istraživanju koje se provodi na dvije generacije. Međutim, preporuča se uzorke ili digitalne zapise sperme generacije P pohraniti radi eventualne kasnije analize.

1.5.5. **Potomstvo**

Svako leglo treba pregledati što je prije moguće nakon okota (nulti dan laktacije) i utvrditi broj i spol mladunaca, broj mrtvorođenih, broj živorođenih, prisutnost velikih anomalija. Mladunce koji su nultog dana nađeni mrtvi, ako nisu macerirani, svakako bi trebalo pregledati s obzirom na postojanje nepravilnosti i uzrok smrti, te konzervirati. Živu mladunčad treba prebrojiti i pojedinačno izvagati kod okota (nulti dan laktacije) ili na dan 1., a zatim redovito na dane vaganja, npr. 4., 7., 14. i 21. dan laktacije. Fizičke anomalije ili anomalije u ponašanju opažene kod ženki ili potomaka treba zabilježiti.

▼B

Fizički razvoj potomaka treba bilježiti uglavnom kroz dobivanje tjelesne mase. Drugi fizički parametri (npr. otvaranje ušiju i očiju, izbijanje zuba, rast kose) mogu dati dodatne informacije, ali njih je poželjno vrednovati u kontekstu podataka o spolnom sazrijevanju (npr. dob i tjelesna masa kod otvaranja vagine ili razdvajanja prepucija na glavici penisa) (13). Ako takva istraživanja nisu obuhvaćena posebnim studijama, preporučaju se funkcionalna istraživanja (npr. motorna aktivnost, osjetilne funkcije, ontogeneza refleksa) potomaka generacije F1 prije i/ili nakon odbijanja od sise, posebno istraživanja koja se odnose na spolno sazrijevanje. Za generaciju F1 upravo odbijenu od sise koja je odabrana za parenje treba utvrditi dob u kojoj je došlo do otvaranja vagine ili razdvajanja prepucija. Ako je utvrđeno da je u generaciji F1 došlo do izmjene u omjeru mužjaka i ženki ili dobi spolne zrelosti, u postnatalnom danu 0 kod mladunaca generacije F2 treba izmjeriti anogenitalni razmak.

Funkcionalna opažanja nisu neophodna u skupinama koje inače pokazuju jasne znakove štetnih učinaka (npr. znatno smanjenje porasta tjelesne mase itd.). Ako se uopće provode, funkcionalna istraživanja ne treba provoditi na mladuncima odabranim za parenje.

1.5.6. **Makroskopska nekropsija**

Na završetku studije ili u slučaju smrti tijekom studije sve roditeljske životinje (P i F1), sve mladunce s vanjskim anomalijama ili kliničkim znakovima, kao i nasumice odabrane mladunce/spol/leglo iz generacija F1 i F2 treba makroskopski pregledati s obzirom na strukturne anomalije ili patološke promjene. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Mladunce koji su humano usmrćeni, na samrti ili mrtvi, ako nisu macerirani, treba pregledati s obzirom na moguće patološke promjene i/ili uzrok smrti, i konzervirati.

Treba pregledati uteruse svih prvorotki, na način koji neće dovesti u pitanje histološku analizu, kako bi se utvrdilo ima li i koliki je broj mjesta za implantaciju embrija.

1.5.7. **Mase organa**

Na kraju istraživanja određuje se tjelesna masa i masa sljedećih organa roditeljskih životinja generacija P i F1 (organe u paru treba vagati pojedinačno):

— uterus, ovariji,

— testisi, epididimisi (ukupno i kaudalni),

— prostata,

— sjemene vezikule s prednjim režnjem prostate i njihovim fluidima i prostatom (kao jedna cjelina),

— mozak, jetra, bubrezi, slezena, hipofiza, tiroidna žlijezda, nadbubrežna žlijezda i poznati ciljni organi.

Kod mladunaca generacije F1 i F2 koji su odabrani za nekropsiju treba odrediti tjelesne mase kod usmrćenja. Treba izvagati sljedeće organe nasumice izabranog mladunca/spola/legla (vidjeti odjeljak 1.5.6.): mozak, slezena i timus.

▼B

Kad je to izvedivo, rezultate makroskopske nekropsije i vaganja organa treba procijeniti u svjetlu opažanja dobivenih u drugim studijama.

1.5.8. **Histopatologija**

1.5.8.1. *Roditeljske životinje*

Sljedeće organe i tkiva roditeljskih životinja (generacije P i F1), ili njihove reprezentativne uzorke, treba fiksirati i pohraniti u odgovarajućem mediju za histopatološki pregled.

— vagina, uterus s cerviksom, i ovariji (konzervirani u odgovarajućem sredstvu),

— jedan testis (konzerviran u Bouinovom ili sličnom fiksativu), jedan epididimis, sjemene vezikule, prostata, i prednji režanj prostate,

— ranije identificirani ciljni organ(i) životinja generacija P i F1 odabranih za parenje.

Gore navedene konzervirane organe i tkiva treba potpuno histopatološki obraditi kod svih životinja generacija P i F1 koje su odabrane za parenje iz skupine izložene visokim dozama i kontrolne skupine. Pregled jajnika roditeljskih životinja P nije obvezan. Organe kod kojih se uočavaju promjene uzrokovane tretiranjem treba pregledati i kod skupina koje su primale male ili srednje doze, a kod kojih se sumnja na smanjenu plodnost, npr. kod životinja koje se nisu parile, nisu začele, proizvele ni porodile zdravo potomstvo, ili kod kojih je bilo utjecaja na javljanje ciklusa estrusa ili broj, pokretljivost ili morfologiju spermatozoida, treba histopatološki obraditi. Obvezno treba ispitati sve makro lezije kao što su atropija ili tumori.

Treba obaviti detaljni histopatološki pregled testisa (npr. upotrebom Bouinovog fiksativa, uklapanjem u parafin i poprečnim rezovima debljine 4–5 μm) kako bi se utvrdili učinci vezani uz tretiranje, primjerice zadržani spermatidi, nepostojanje određenih slojeva ili tipova zametnih stanica, divovske stanice s više jezgri ili odbacivanje spermatogenih stanica u lumen (14). Pregledom intaktnog epididimisa treba obuhvatiti glavu, tijelo i rep, što se može postići analizom uzdužnog presjeka. Epididimis treba pregledati s obzirom na infiltraciju leukocita, promjenu prevladavajućih tipova stanica, atipične tipove stanica i fagocitozu spermatozoida. Za pregled muških reproduktivnih organa može se koristiti bojenje Periodic Acid–Schiff (PAS) metodom ili bojenje hematoksilinom.

Nakon razdoblja laktacije jajnik bi trebao sadržavati primordijalne folikule i folikule u rastu kao i velika žuta tijela iz laktacije. Histopatološkim pregledom treba otkriti kvalitativno pražnjenje populacije primordijalnih folikula. Kvantitativnu procjenu primordijalnih folikula treba provesti za ženke generacije F1; broj životinja, odabir presjeka jajnika i veličina presjeka koji se koristi kao uzorak trebaju statistički odgovarati postupku procjene koji se koristi. Radi usporedbe tretiranih i kontrolnih jajnika, pregled treba obuhvatiti brojanje primordijalnih folikula, kombinirano s malim folikulima u rastu (15)(16)(17 (18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Životinje upravo odbijene od sise*

Kod svih mladunaca s vanjskim anomalijama ili kliničkim znakovima, kao i od nasumice odabranog mladunca/spola/legla iz obje generacije F1 i F2, koji nisu bili odabrani za parenje, treba fiksirati tkivo i ciljne organe s makro anomalijama i pohraniti u odgovarajući medij za histopatološki pregled. Potpunu histopatološku karakterizaciju konzerviranog tkiva treba obaviti s posebnim naglaskom na organe reproduktivnog sustava.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

U izvješću treba navesti pojedinačne podatke, sažete u obliku tablice, o broju životinja na početku ispitivanja, broju životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj plodnih životinja, broj skotnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis opaženih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i ozbiljnost toksičkih učinaka, vrste opažanja generacija roditelja i potomaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu, za svaku ispitnu skupinu i svaku generaciju.

Numeričke rezultate treba procijeniti primjerenom, opće prihvaćenom statističkom metodom; odabir statističke metode obavlja se u okviru planiranja studije i njegovu opravdanost treba dokazati. Za analiziranje podataka mogu biti korisni statistički modeli doza–reakcija. Izvješće treba sadržavati dovoljno informacija o analitičkoj metodi i računalnom programu koji je korišten, kako bi neovisni revizor/statističar mogao procijeniti i rekonstruirati analizu.

2.2. VREDNOVANJE REZULTATA

Nalaze studije reproduktivne toksičnosti na dvije generacije treba vrednovati s obzirom na opažene učinke uključujući nekropsiju i mikroskopske nalaze. Vrednovanje treba obuhvatiti postojanje ili izostanak odnosa između doze ispitivane tvari i prisutnosti ili izostanka, učestalosti ili ozbiljnosti anomalija, uključujući makro lezije, identificirane ciljne organe, promjene u pogledu plodnosti, kliničke anomalije, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksičke učinke. Kod vrednovanja rezultata ispitivanja treba uzeti u obzir fizikalno–kemijska svojstva ispitivane tvari i, ako su dostupni, toksikokinetičke podatke.

Pravilno provedeno ispitivanje reproduktivne toksičnosti treba osigurati zadovoljavajuću procjenu visine doze bez štetnog djelovanja i razumijevanje štetnih učinaka na reprodukciju, parturiciju, laktaciju, postnatalni razvoj uključujući rast i spolni razvoj.

▼B

2.3. TUMAČENJE REZULTATA

Studija reproduktivne toksičnosti na dvije generacije dat će informacije o učincima ponavljanog izlaganja nekoj tvari tijekom svih faza reproduktivnog ciklusa. Studija će dati informacije posebno o reproduktivnim parametrima, i o razvoju, rastu, sazrijevanju i preživljavanju potomaka. Rezultate studije treba tumačiti u vezi s nalazima subkroničnih studija, studija o prenatalnom razvoju, toksikokinetičkim i drugim dostupnim studijama. Rezultati ove studije mogu se iskoristiti za procjenu potrebe daljnjeg ispitivanja kemikalije. Ekstrapolacija rezultata ove studije na čovjeka vrijedi u ograničenoj mjeri. Najbolje ih je iskoristiti kao informacije o visinama bez štetnih učinaka i dozvoljenom izlaganju ljudi (20)(21)(22)(23).

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati slijedeće informacije:

ispitivana tvar:

— fizikalna priroda i, ako je relevantno, fizikalno–kemijska svojstva,

— podaci o identifikaciji,

— čistoća.

Nosač (ako je primjereno):

— opravdanost izbora nosača, za sve nosače osim vode.

Ispitne životinje:

— vrsta/soj koji je upotrijebljen,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana, materijal za izradu gnijezda itd.

— pojedinačne mase životinja na početku istraživanja.

Uvjeti ispitivanja:

— podloge za odabir visine doze,

— pojedinosti o sastavu ispitivane tvari/pripremi hrane, postignutim koncentracijama,

— stabilnost i homogenost pripravka,

— pojedinosti o davanju ispitivane tvari,

— preračunavanje koncentracije (ppm) ispitivane tvari u hrani/vodi za piće u postignutu dozu (mg/kg tjelesne mase/dan), ako je primjenljivo,

— podaci o kvaliteti hrane i vode.

▼B

Rezultati:

— potrošnja hrane i, ako je dostupno, potrošnja vode, stupanj iskorištenja hrane (porast tjelesne mase po gramu utrošene hrane) i utrošak ispitnog materijala za životinje generacije P i F1, osim u razdoblju kohabitacije i minimalno zadnju trećinu razdoblja laktacije,

— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),

— podaci o tjelesnoj masi za životinje generacije P i F1 koje su bile odabrane za parenje,

— podaci o masi mladunaca i legla,

— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o apsolutnoj i relativnoj masi organa za roditeljske životinje,

— karakter, ozbiljnost i trajanje kliničkih opažanja (jesu li reverzibilna ili ne),

— vrijeme smrti tijekom studije ili preživljavanje životinja do završetka studije,

— podaci o toksičkoj reakciji po spolu i dozi, uključujući pokazatelje o parenju, plodnosti, gestaciji, rođenju, preživljavanju i laktaciji; u izvješće treba navesti brojeve koji su poslužili za izračun tih pokazatelja,

— toksički ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis svih histoloških nalaza,

— broj ženki generacija P i F1 koje su imale normalne cikluse, i dužina ciklusa,

— ukupan broj spermatozoida iz kaudalnog epididimisa, postotak progresivno pokretljivih spermatozoida, postotak morfološki normalnih spermatozoida, i postotak spermatozoida po svakoj identificiranoj anomaliji,

— vrijeme koje je proteklo do parenja, izraženo u danima,

— duljina gestacije,

— broj implantacija, žutih tijela, veličina legla,

— broj živorođenih i gubitaka nakon implantacija,

— broj mladunaca s jako izraženim anomalijama; treba navesti broj patuljaka, ako je utvrđen,

— podaci o fizičkim posebnostima potomaka i drugi postnatalni podaci, s tim da za ocijenjene fizičke posebnosti treba navesti razloge,

— podaci o funkcionalnim opažanjima kod mladunaca i odraslih životinja, ako je primjenljivo,

— prema potrebi, statistička obrada rezultata.

▼B

Rasprava o rezultatima

Zaključci, uključujući vrijednosti kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL) na roditelje i potomstvo.

4. **REFERENCE**

(1) Sadleir, R.M.F.S., (1979) Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilisation, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989) A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, str. 92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991) The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology*, 5, str. 39-44.

(5) Seed, J. et al., (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology*, 10(3), str. 237-244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992) Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology*, 6, str. 267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992) Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology*, 13, str. 409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991) Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology*, 5, str. 449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993) Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida, str. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al., (1989) The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology, 10, str. 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987) Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology, 8, str. 330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992) Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology, 6, str. 491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977) Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction, 17, str. 298-303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993) Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, str. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989) Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al., (1991) Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology, 5, str. 379-383.

(19) Heindel, J.J., (1999) Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A., (1991) Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989) Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K., (1981) In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K., (1978) In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOKSIKOKINETIKA**

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 417 (2010.). Studije kojima se istražuje toksikokinetika (TK) ispitivane kemikalije provode se radi prikupljanja odgovarajućih informacija o njezinoj apsorpciji, distribuciji, biotransformaciji (tj. metabolizmu) i izlučivanju te radi pomoći u povezivanju koncentracije ili doze s opaženom toksičnošću te radi pomoći pri razumijevanju mehanizma njezine toksičnosti. TK može pomoći pri razumijevanju studija toksičnosti na način da se pokaže da se pokusne životinje sustavno izlažu ispitivanoj kemikaliji te otkrivanjem cirkulirajućih dijelova (početna kemikalija/metaboliti). Osnovni parametri TK određeni tim studijama također će pružiti informacije o potencijalu za akumulaciju ispitivane kemikalije u tkivima i/ili organima te potencijal induciranja biotransformacije kao rezultat izlaganja ispitivanoj kemikaliji.

2. Podaci o TK mogu pridonijeti određivanju prikladnosti i relevantnosti podataka o toksičnosti za životinje radi ekstrapolacije rizika po ljude i/ili procjenu rizika. Osim toga, studije toksičnosti mogu pružiti korisne informacije za određivanje visina doze za studije toksičnosti (linearna i nelinearna kinetika), učinaka načina primjene, bioraspoloživosti te probleme povezane s planiranjem studija. Određeni tipovi TK podataka mogu se upotrijebiti u razvoja modela fiziološki utemeljene toksikokinetike (PBTK).

3. Postoje važne primjene za podatke o metabolitu/TK poput sugeriranja mogućih toksičnosti i načina djelovanja te njihova odnosa s visinom doze i načinom izlaganja. Povrh toga, podaci o metabolizmu mogu pružiti korisne informacije za određivanje toksikološkog značaja izlaganja za egzogeno proizvedene metabolite ispitivane kemikalije.

4. Odgovarajući toksikokinetički podaci pomoći će u podršci daljnje prihvatljivosti i primjenjivosti kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti, pristupima analognog predviđanja (read-across) i grupiranja u procjeni sigurnosti kemikalija. Podaci o kinetici također se mogu upotrijebiti za vrednovanje toksikološke relevantnosti drugih studija (npr. *in vivo*/*in vitro*).

5. Osim ako nije spomenut drugi način primjene (vidjeti posebno stavke 74. - 78.), ova ispitna metoda može se primijeniti na oralnu primjenu ispitivane kemikalije.

UVODNA RAZMATRANJA

6. Regulatorni sustavi imaju drukčije zahtjeve i potrebe u svezi s mjerenjem konačnih učinaka i parametara povezanih s toksikokinetikom za različite razrede kemikalija (npr. pesticida, biocida, industrijskih kemikalija). Za razliku od većine ispitnih metoda, ove ispitna metoda opisuje ispitivanje toksikokinetike koje uključuje višestruka mjerenja i konačne učinke. U budućnosti će se možda razviti nekoliko novih ispitnih metoda i/ili smjernica za poseban i detaljniji opis svakog konačnog učinka. U slučaju ove ispitne metode zahtjevi i/ili potrebe svakog regulatornog sustava određuju koja će se ispitivanja ili određivanja provoditi.

▼M4

7. Postoje brojne studije koje se mogu provesti za vrednovanje TK ponašanja ispitivane kemikalije u regulatorne svrhe. Međutim, ovisno o specifičnim regulatornim potrebama ili situacijama, za vrednovanje ispitivane kemikalije nisu potrebne sve od tih mogućih studija. U planiranju studija toksikokinetičnosti potrebna je fleksibilnost, uzimajući u obzir svojstva ispitivane kemikalije. U nekim je slučajevima moguće istraživati samo određeni komplet pitanja kako bi se odredila opasnost povezana s ispitivanom kemikalijom i udjelom rizika. U nekim se slučajevima TK podaci mogu prikupljati kao dio vrednovanja u drugim toksikološkim studijama. Za druge pak situacije mogu biti potrebna dodatne i/ili opsežnije studije TK-a, ovisno o regulatornim potrebama i/ili u slučaju pojavljivanja novih pitanja kao dijela vrednovanja ispitivane kemikalije.

8. Laboratorij koji provodi ispitivanje u obzir mora uzeti sve raspoložive informacije o ispitivanoj kemikaliji i relevantnim metabolitima i analognim tvarima prije provođenja studije kako bi povećao kvalitetu studije i na minimum sveo primjenu životinja. To može obuhvaćati podatke iz drugih relevantnih ispitnih metoda (studije *in vivo*, studije *in vitro* i/ili vrednovanja *in silico*). Fizikalno-kemijska svojstva, kao što su koeficijent razdjeljenja oktanol-voda (izražen kao log P_{OW}), pKa, topljivost u vodi, tlak pare i molekularna masa kemikalije mogu biti korisna za planiranje studije i tumačenje rezultata. Ona se mogu odrediti primjenom odgovarajućih metoda, kao što je opisano u relevantnoj ispitnoj metodi.

OGRANIČENJA

9. Ova ispitna metoda nije osmišljena kao odgovor na posebne okolnosti, kao što su gravidne životinje ili životinje tijekom laktacije i mladunčad, ni za vrednovanje potencijalnih ostataka u izloženih životinja koje proizvode hranu. Međutim, podaci dobiveni iz studije B.36 mogu pružiti pozadinske informacije za vođenje pri planiranju specifičnih studija za takva istraživanja. Ova ispitna metoda nije namijenjena testiranju nanomaterijala. Izvješće o preliminarnoj reviziji OECD-ovih smjernica za ispitivanje za njihovu primjenjivost na nanomaterijale pokazuje da se TG 417 (ekvivalentna ovoj ispitnoj metodi B.36) ne može primijeniti na nanomaterijale (1).

DEFINICIJE

10. Definicije upotrijebljene u svrhu ove ispitne metode navedene su u Dodatku.

RAZMATRANJA O DOBROBITI ŽIVOTINJA

11. Upute o humanom postupanju sa životinjama dostupne su u OECD-ovoj Smjernici (GD) 19 (2). Preporučuje se konzultiranje s OECD-ovom Smjernicom 19. za sve studije *in vivo* i *in vitro* opisane u ovoj ispitnoj metodi.

OPIS METODA

Pilotske studije

12. Primjena pilotskih studija preporučuje se i potiče za odabir pokusnih parametara za studije toksikokinetike (npr. metabolizam, bilanca mase, analitički postupci, pronalaženje doza, izdisanje CO_2 itd.). Za karakterizaciju nekih od tih parametara nije potrebna primjena radioaktivno označenih kemikalija.

▼M4

Odabir životinja

Vrste

13. Vrste (i sojevi) životinja upotrijebljenih za ispitivanje TK po mogućnosti trebaju biti jednaki kao i životinja upotrijebljenih u drugim toksikološkim studijama provedenima s predmetnom ispitivanom kemikalijom. Obično se treba primijeniti štakor, kao što je raširen običaj u toksikološkim studijama. Primjena drugih ili dodatnih vrsta može biti opravdana ako studije kritične toksičnosti dadnu dokaze o značajnoj toksičnosti u tih vrsta ili ako se pokaže da je njihova toksičnost/toksikokinetika relevantnija za ljude. Treba pružiti obrazloženje za odabir vrsta i sojeva životinja.

14. Osim ako nije drukčije navedeno, ova ispitna metoda odnosi se na štakore kao pokusnu vrstu. Određeni aspekti ove metode mogu se promijeniti za primjenu drugih pokusnih vrsta.

Starost i soj

15. Treba upotrebljavati mlade, zdrave, odrasle jedinke (obično u dobi od 6 - 12 tjedana u vrijeme doziranja) (vidjeti još i stavke 13. i 14.). Treba pružiti obrazloženje za primjenu životinja koje nisu mlade odrasle jedinke. Sve životinje moraju biti slične dobi na početku studije. Varijacije u masi pojedinih životinja ne smiju biti veće od ± 20 % prosječne mase ispitne skupine. U idealnom slučaju treba upotrijebiti isti soj koji se upotrijebio i za dobivanje toksikološke baze podataka za ispitivanu kemikaliju.

Broj i spol životinja

16. Za svaku ispitnu dozu treba upotrijebiti najmanje četiri životinje istog spola. Treba pružiti obrazloženje za spol upotrijebljenih životinja. Primjenu obaju spolova (četiri mužjaka i četiri ženke) treba uzeti u obzir ako postoji dokaz o značajnim razlikama u toksičnosti povezanima sa spolom.

Uvjeti smještaja i hranjenja

17. Tijekom razdoblja ispitivanja životinje načelno treba smjestiti pojedinačno. Skupni smještaj može biti opravdan u posebnim uvjetima. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati tame. Temperatura prostorije za ispitivanje životinje mora iznositi 22 °C (± 3 °C), a relativna vlažnost zraka 30 - 70 %. Za hranjenje se može primjenjivati konvencionalna laboratorijska prehrana uz neograničene količine pitke vode.

Ispitivana kemikalija

18. Ispitivana kemikalija koja je radioaktivno obilježena pomoću ^{14}C treba se primijeniti za sve aspekte studije u svezi s bilancom mase i identifikacijom metabolita, međutim može se pokazati:

— da se bilanca mase i identifikacija metabolita može prikladno vrednovati primjenom neobilježene ispitivane kemikalije,

— da je analitička specifičnost i osjetljivost metode upotrijebljene s neradioaktivnom ispitivanom kemikalijom jednaka ili veća od one koja se može postići s radioaktivno obilježenom ispitivanom kemikalijom,

▼M4

da se tada ne mora upotrijebiti radioaktivno obilježena ispitivana kemikalija. Nadalje, mogu se upotrijebiti i drugi radioaktivni i stabilni izotopi, posebno ako je element odgovoran za toksični segment ispitivane kemikalije ili je dio tog toksičnog segmenta. Ako je moguće, radioaktivnu oznaku treba locirati u središnjem dijelu molekule koja je metabolički stabilna (ne može se zamijeniti, ne uklanja se metabolički kao CO_2 i ne postaje dio monokarbonske zalihe organizma). Označavanje više mjesta ili specifičnih regija molekule može biti potrebno radi praćenja metaboličke sudbine ispitivane kemikalije.

19. Radioaktivno obilježene i radioaktivno neobilježene ispitivane kemikalije treba analizirati primjenom odgovarajućih metoda radi utvrđivanja čistoće i identiteta. Radioaktivna čistoća radioaktivne ispitivane kemikalije mora biti najveća koja se može postići za određenu ispitivanu kemikaliju (u idealnom slučaju mora biti veća od 95 %) i treba uložiti razuman napor za identifikaciju nečistoća prisutnih na 2 % ili više. Treba podnijeti izvješće o čistoći, identitetu i udjelu identificiranih nečistoća. Individualni regulatorni programi mogu odabrati pružanje dodatnih uputa za podršku pri definiranju i specifikacijama ispitivanih kemikalija složenih od smjesa i metoda za određivanje čistoće.

Odabir doza

Pilotska studija

20. Za pilotsku je studiju obično dovoljna jedna oralna doza. Doza mora biti netoksična, ali dovoljno visoka kako bi omogućila identifikaciju metabolita u izlučevinama (i plazmi ako je potrebno) te kako bi ispunila određeni cilj pilotske studije, kao što je navedeno u stavku 12. ove ispitne metode.

Glavne studije

21. Za glavne studije prednost se daje najmanje dvjema dozama jer informacije prikupljene od najmanje dviju skupina koje primaju dozu mogu pomoći pri određivanju doza u drugim studijama toksičnosti te pomoći pri određivanju reakcije na dozu u već dostupnim ispitivanjima toksičnosti.

22. Ako se daju dvije doze, obje moraju biti dovoljno visoke kako bi omogućile identifikaciju metabolita u izlučevinama (i plazmi ako je potrebno). Za odabir doza u obzir treba uzeti informacije iz dostupnih podataka o toksičnosti. Ako te informacije nisu dostupne (npr. iz studija akutne oralne toksičnosti koje bilježe kliničke znakove toksičnosti ili iz studija toksičnosti uz primjenu ponovljenih doza), u obzir se mogu uzeti vrijednost za višu dozu koja je manja od procijenjenog LD_{50} (oralni i dermalni način primjene) ili LC_{50} (primjena inhalacijom) ili manja od niže vrijednosti procijenjenog raspona akutne toksičnosti. Niža doza mora biti razlomak više doze.

23. Ako se ispituje samo jedna visina doze, u idealnom slučaju doza mora biti dovoljno visoka kako bi omogućila identifikaciju metabolita u izlučevinama (i plazmi ako je potrebno), a da ne izaziva očitu toksičnost. Treba pružiti argumente za neuključivanje druge visine doze.

24. Ako treba ustanoviti učinak doze na kinetičke procese, dvije doze neće biti dovoljne, a barem jedna doza mora biti dovoljno visoka kako bi došlo do zasićenja tih procesa. Ako područje ispod krivulje koncentracije plazme u ovisnosti o vremenu (AUC) nije linearno između dviju visina doza korištenih u glavnoj studiji, to snažno upućuje na to da se zasićenje jednog ili više kinetičkih procesa odvija negdje između dviju visina doza.

▼M4

25. Za ispitivane kemikalije niske toksičnosti treba upotrijebiti maksimalnu dozu od 1 000 mg/kg tjelesne mase (oralna i dermalna primjena) (ako se daje inhalacijom, upute potražite u Poglavlju B.2 ovog Priloga, ta doza obično ne prelazi 2 mg/l). Za razmatranja o specifičnostima kemikalije nije potrebna viša doza, ovisno o regulatornim potrebama. Uvijek treba obrazložiti odabir doze.

26. Podaci o toksikokinetici jedne doze i podaci o distribuciji u tkivu mogu biti prikladni za određivanje potencijala za akumulaciju i/ili postojanost. No, u nekim je slučajevima potrebna primjena ponovljene doze i) kako bi se cjelovitije pristupilo potencijalu akumulacije i/ili postojanosti promjena u TK (npr. indukcija i inhibicija enzima) ili ii) kao što zahtijeva primjenjivi regulatorni sustav. U studijama koje uključuju ponovljenu primjenu doza, dok je obično dovoljna ponovljena primjena niske doze, u određenim uvjetima može također biti potrebna ponovljena primjena visoke doze (vidjeti još i stavak 57.).

Primjena ispitivane kemikalije

27. Ispitivanu kemikaliju treba otopiti ili homogeno suspendirati u istom nosaču koji se koristio i za druge studije provedene primjenom oralnom sondom s istom ispitivanom kemikalijom ako su dostupne informacije o tom nosaču. Treba navesti argumentaciju za odabir nosača. Pri planiranju studije treba razmotriti odabir nosača i količinu doziranja. Uobičajena metoda primjene jest primjena sondom, no, u specifičnim situacijama može biti korisna primjena preko želatinozne kapsule ili kao primjesa hrani (u oba slučaja treba pružiti obrazloženje). Treba pružiti dokaz o stvarnoj dozi primijenjenoj na svakoj životinji.

28. Maksimalna količina tekućine koja se primjenjuje oralnom sondom odjedanput ovisi o veličini pokusne životinje, tipu nosača za doziranje te o tome je li hranjenje obustavljeno prije primjene ispitivane kemikalije ili nije. Treba navesti argumentaciju za davanje ili uskraćivanje hrane prije doziranja. Količinu obično treba održavati što je moguće manjom za nosače s vodenom otopinom ili nosače bez vodene otopine. Količina doze obično ne bi smjela biti veća od 10 ml/kg tjelesne mase za glodavce. Količine nosača korištenih za više lipofilnih ispitivanih kemikalija mogu početi od 4 ml/kg tjelesne mase. Za ponovljenu primjenu doza, u slučaju da je kontraindiciran svakodnevni post, u obzir treba uzeti manje količine doza (npr. 2 - 4 ml/kg tjelesne mase). Ako je moguće, u obzir treba uzeti primjenu količine doze usklađene s dozom primijenjenoj u drugim studijama primjene ispitivane kemikalije pomoću oralne sonde.

29. Za određivanje bioraspoloživosti ili relativne oralne apsorpcije može se upotrijebiti intravenozna (IV) primjena ispitivane kemikalije i mjerenje ispitivane kemikalije u krvi i/ili izlučevinama. Za IV studije jedna doza (obično ekvivalentna nižoj oralnoj dozi, ali da nije veća od nje - vidjeti odabir doza) ispitivane kemikalije daje se uz primjenu odgovarajućeg nosača. Taj materijal treba primjenjivati u prikladnoj količini (npr. 1 ml/kg tjelesne mase) na odabrano mjesto primjene najmanje četirima životinjama odgovarajućeg spola (ako je opravdano, mogu se upotrebljavati oba spola, vidjeti stavak 16.). Za IV primjenu ispitivane kemikalije potreban je posve rastopljen ili otopljen pripravak doze. Nosač za IV primjenu ne smije negativno utjecati na integritet krvi ili protok krvi. Ako se ispitivana kemikalija primjenjuje

▼M4

preko infuzije, brzinu infuzije treba zabilježiti i standardizirati među životinjama te se pobrinuti da se upotrebljava infuzijska pumpa. Ako se kanila uvodi u jugularnu venu (radi primjene ispitivane kemikalije i/ili prikupljanje krvi) ili ako se za primjenu koristi femoralna arterija, treba primijeniti anesteziju. Dovoljnu pozornost treba obratiti na tip anestezije jer isti može utjecati na toksikokinetiku. Životinjama se prije primjene ispitivane kemikalije s nosačem mora omogućiti odgovarajući oporavak.

30. Drugi načini primjene, kao što je dermalni način i inhalacija (vidjeti stavke 74. - 78.), mogu se primjenjivati za određene ispitivane kemikalije uzimajući u obzir njihova fizikalno-kemijska svojstva i očekivanu ljudsku uporabu ili izlaganje.

Mjerenja

Bilanca mase

31. Bilanca mase određena je zbrojem postotka primijenjene (radioaktivne) doze izlučene u urinu, izmetu i izdahnutom zraku i postotka prisutnog u tkivima, ostacima trupla te ispirku kaveza (vidjeti stavak 46.). Općenito se ukupan oporavak od primijenjene ispitivane kemikalije (radioaktivnost) smatra prikladnim ako je > 90 %.

Apsorpcija

32. Početna procjena apsorpcije može se postići isključivanjem postotka doze u gastrointestinalnom (GI) traktu i/ili izmetu iz određivanja bilance mase. Za izračun postotka apsorpcije vidjeti stavak 33. Za ispitivanje izlučevina vidjeti stavke 44. - 49. Ako se točna mjera apsorpcije uz primjenu oralnog doziranja ne može odrediti iz studija bilance mase (npr. ako je u izmetu prisutno više od 20 % primijenjene doze), mogu biti potrebna daljnja istraživanja. Te studije mogu kompromitirati 1) oralnu primjenu ispitivane kemikalije i mjerenje ispitivane kemikalije u žuči ili 2) oralnu i IV primjenu ispitivane kemikalije i mjerenje neto ispitivane kemikalije prisutne u mokraći plus truplu za svaki od dvaju načina primjene. U oba plana studije mjerenje radioaktivnosti provodi se kao surogatna metoda za specifičnu kemijsku analizu ispitivane kemikalije i metabolita.

33. Ako se provodi studija žučnih izlučevina, obično se koristi oralni način primjene. U tom slučaju u žučne kanale najmanje četiriju životinja odgovarajućeg spola (ili obaju spolova ako je opravdano) treba uvesti kanilu i primijeniti jednu dozu ispitivane kemikalije. Sljedeća primjena ispitivane kemikalije, izlučivanja radioaktivnosti/ispitivane kemikalije u žuči treba nadzirati dokle god je potrebno kako bi se procijenio postotak primijenjene doze koja se izlučuje tim putem, što se može upotrijebiti za izravan izračun opsega oralne apsorpcije na sljedeći način:

$$\text{postotak apsorpcije} = \frac{(\text{količina u žuči} + \text{mokraći} + \text{izdahnutom zraku} + \text{truplu bez sadržaja u GI traktu})/\text{primijenjena količina}}{\times\ 100}$$

34. S nekim razredima ispitivane kemikalije može se dogoditi izravna sekrecija apsorbirane doze preko crijevnih membrana. U tim se slučajevima mjerenje postotka doze u izmetu nakon oralne primjene u glodavaca s kanilom u žučnom kanalu ne smatra reprezentativnim za neapsorbiranu dozu. Preporučuje se da se u slučaju sumnje na crijevnu sekreciju postotak apsorbirane doze temelji na apsorpciji izračunatoj iz usporedbe izlučevina nakon oralne i IV primjene (netretirani štakori ili štakori s kanilom u žučnom kanalu) (vidjeti stavak 35.). Također se preporučuje da se u slučaju da se kvantifikacija crijevne sekrecije smatra potrebnom, izlučivanje kod štakora s kanilom u žučnom kanalu izmjeri nakon IV primjene doze.

▼M4

Bioraspoloživost

35. Bioraspoloživost se može odrediti iz kinetike plazme/krvi oralnih i IV skupina kao što je opisano u stavcima 50. - 52., specifičnom kemijskom analizom ispitivane kemikalije i/ili relevantnog/ih metabolita tako da nije potrebna radioaktivno obilježena ispitivana kemikalija. Bioraspoloživost (F) ispitivane kemikalije ili relevantnog/ih metabolita može se izračunati na sljedeći način:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (doza_{IV}/doza_{exp})$$

gdje je AUC područje ispod krivulje koncentracije plazme u ovisnosti o vremenu, a exp je pokusni način primjene (oralni, dermalni ili inhalacijom).

36. Za primjenu i određivanje rizika od sistemskih učinaka, bioraspoloživosti toksične komponente općenito se daje prednost nad postotkom apsorpcije pri usporedbi sistemskih koncentracija iz studija na životinjama s analognim podacima dobivenima biološkim nadzorom iz studija o izlaganju radnika. Situacija može postati složenija ako su doze u nelinearnom omjeru tako da je važno da se u preventivnom ispitivanju toksikokinetike odrede doze u linearnom rasponu.

Distribucija u tkivu

37. Poznavanje distribucije ispitivane kemikalije i/ili njezinih metabolita u tkivu važno je za identifikaciju tkiva meta, razumijevanje temeljnih mehanizama toksičnosti te dobivanje informacija o potencijalu akumulacije i postojanosti ispitivane kemikalije i metabolita. Postotak ukupne (radioaktivne) doze u tkivima i ostacima trupla treba minimalno mjeriti na kraju pokusa s izlučevinama (npr. tipično do 7 dana nakon primjene doze ili manje, ovisno o specifičnom ponašanju ispitivane kemikalije). Ako se na završetku studije u tkivima ne otkrije ispitivana kemikalija (npr. zato što je ispitivana kemikalija uklonjena prije završetka studije zbog kratkog vremena poluraspada), treba se pobrinuti da se podaci ne protumače pogrešno. U takvoj situaciji treba ispitati distribuciju u tkivu u vrijeme vršne koncentracije ispitivane tvari (i/ili metabolita) u plazmi/krvi (T_{max}) ili vršnu stopu mokraćnih izlučevina ako je potrebno (vidjeti stavak 8.). Nadalje, može biti potrebno skupljati tkivo u dodatnim vremenskim točkama kako bi se odredila distribucija ispitivane kemikalije i/ili njezinih metabolita u tkivu, kako bi se ocijenila ovisnost o vremenu (ako je potrebno), kako bi se pomoglo u utvrđivanju bilance mase i/ili ako to zahtijeva nadležno tijelo. Tkiva koja treba prikupiti uključuju jetru, mast, GI trakt, bubreg, slezenu, cijelu krv, ostatke trupla, tkiva organa meta i sva druga tkiva (npr. štitnjaču, eritrocite, reproduktivne organe, kožu, oko (posebno u pigmentiranih životinja) od potencijalnog značenja u toksikološkoj ocjeni ispitivane kemikalije. Treba razmotriti analizu dodatnih tkiva u isto vrijeme kako bi se na maksimum povećala primjena životinja te u slučaju da je u studijama subkronične ili kronične toksičnosti opažena toksičnost organa meta. Treba također podnijeti izvješće o (radioaktivnoj) preostaloj koncentraciji i omjerima tkiva i plazme (krv).

38. Nadležno tijelo također može trebati ili tražiti vrednovanje distribucije u tkivima u dodatnim vremenskim točkama poput vremena vršne koncentracije plazme/krvi (npr. T_{max}) ili vršne stope mokraćnih izlučevina dobivenu iz odgovarajućih pokusa kinetike plazme/krvi ili izlučevina. Ta informacija može biti korisna za razumijevanje toksičnosti i potencijala ispitivane kemikalije i akumuliranja i postojanosti metabolita. Treba pružiti obrazloženje za odabir uzoraka, uzorci za analizu općenito moraju biti jednaki kao i oni gore (vidjeti stavak 37.).

▼M4

39. Kvantifikacija radioaktivnosti za studije distribucije u tkivu može se provesti uz primjenu seciranja organa, homogenizacije, izgaranja i/ili solubilizacije uz zatim tekućinsko scintilacijsko brojanje (LSC) uhvaćenih ostataka. Određene tehnike, trenutačno u raznim stadijima razvoja, npr. kvantitativna autoradiografija cijelog tijela i mikroskopska autoradiografija receptora, mogu se pokazati korisnima pri određivanju distribucije ispitivane kemikalije u organima i/ili tkivima (3) (4).

40. Za drukčije načine primjene osim oralnog treba prikupiti i analizirati specifična tkiva kao što su pluća u studijama pomoću inhalacije te koža u dermalnim studijama. Vidjeti stavke 74. - 78.

Metabolizam

41. Izlučevine (i plazmu ako je potrebno) treba skupiti radi identifikacije i kvantifikacije nepromijenjene ispitivane kemikalije i metabolita, kao što je opisano u stavcima 44. - 49. Prihvatljivo je udruživanje izlučevina radi olakšanja identifikacije metabolita unutar zadane skupine koja prima dozu. Preporučuje se profiliranje metabolita iz svakog vremenskog razdoblja. No, ako nedostatak uzoraka i/ili radioaktivnosti to ne dopusti, udruživanje urina i izmeta iz nekoliko vremenskih točaka je prihvatljivo, ali nije prihvatljivo udruživanje iz različitih spolova ili doza. Za analizu urina, izmeta, istekle radioaktivnosti tretiranih životinja te žuči, ako je potrebno, treba primijeniti odgovarajuće kvalitativne i kvantitativne metode.

42. Treba se razumno potruditi oko identifikacije metabolita prisutnih u 5 % ili više primijenjene doze te oko izrade metaboličke sheme za ispitivanu kemikaliju. Treba identificirati ispitivane kemikalije koje su karakterizirane u izlučevinama koje obuhvaćaju 5 % ili više primijenjene doze. Identifikacija se odnosi na točno određenje strukture komponenti. Tipično se identifikacija obavlja ko-kromatografijom metabolita s poznatim standardima uz primjenu dvaju disimilarnih sustava ili tehnikama koje omogućuju pozitivnu identifikaciju strukture, kao što je spektrometrija masa, nuklearna magnetska rezonanca (NMR) itd. U slučaju ko-kromatografije kromatografske tehnike uz primjenu iste stacionarne faze s dvama različitim sustavima otapala ne smatraju se prikladnom dvometodnom provjerom identiteta metabolita jer te da metode nisu neovisne. Identifikaciju ko-kromatografijom treba provesti uz primjenu dvaju disimilarnih, analitički neovisnih sustava kao što su reverzna i normalna faza tankoslojne kromatografije (TLC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Ako se pokaže da je kromatografska separacija odgovarajuće kvalitete, nije potrebna dodatna potvrda spektroskopskim srednjim vrijednostima. Alternativno se jednoznačna identifikacija može postići primjenom metoda koje pružaju informacije o strukturi kao što su: tekućinska kromatografija/spektrometrija masa (LC-MS) ili tekućinska kromatografija/tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), plinska kromatografija/spektrometrija masa (GC-MS) i spektrometrija NMR.

43. Ako na 5 % ili više primijenjene doze nije moguće identificirati metabolite, u završnom izvješću treba pružiti obrazloženje. Može biti prikladno identificirati metabolite u manje od 5 % primijenjene doze kako bi se postiglo bolje razumijevanje metaboličkog tijeka procjene opasnosti i/ili rizika od ispitivane kemikalije. Kad god je moguće, treba pružiti potvrdu strukture. To može uključivati profiliranje u plazmi ili krvi ili drugim tkivima.

▼M4

Ekskrecija

44. Brzinu i opseg ekskrecije primijenjene doze treba odrediti mjerenjem postotka rekuperirane (radioaktivne) doze iz urina, izmeta i izdahnutog zraka. Ti će podaci pomoći i u određivanju bilance mase. Količine ispitivane kemikalije (radioaktivnost) elimirane putem urina, izmeta i izdahnutog zraka treba odrediti u odgovarajućim vremenskim intervalima (vidjeti stavke 47. - 49.). Pokusi s primjenom ponavljanih doza moraju se pravilno isplanirati kako bi se omogućilo prikupljanje podataka o ekskreciji radi ispunjenja ciljeva opisanih u stavku 26. To će omogućiti usporedbu s pokusima s primjenom jedne doze.

45. Ako pilot studija pokaže da se u izdahnutom zraku ne eliminira značajna količina ispitivane kemikalije (radioaktivnost) (u skladu sa stavkom 49.), u konačnoj studiji ne treba skupljati izdahnuti zrak.

46. Svaku životinju treba smjestiti u odvojenu metaboličku jedinicu za skupljanje izlučevina (urina, izmeta i izdahnutog zraka). Na kraju svakog razdoblja skupljanja (vidjeti stavke 47. - 49.), metaboličke jedinice treba isprati prikladnim otapalom (to je poznato kao „ispiranje kaveza") kako bi se osigurala maksimalna rekuperacija ispitivane kemikalije (radioaktivnost). Skupljanje izlučevina treba završiti nakon 7 dana ili nakon rekuperacije najmanje 90 % primijenjene doze, ovisno o tome što nastupi prvo.

47. Ukupne količine ispitivane kemikalije (radioaktivnost) u mokraći treba odrediti u najmanje dvije vremenske točke 1. dana skupljanja, od kojih jedna mora biti na 24 h nakon primjene doze, a zatim svakodnevno do završetka studije. Savjetuje se odabir više od dva trenutka uzorkovanja prvog dana (npr. na 6, 12 i 24 h). Rezultate pilot studija treba analizirati radi informacije o drugim ili dodatnim vremenskim točkama za skupljanje. Treba pružiti argumentaciju za raspored skupljanja.

48. Ukupne količine ispitivane kemikalije (radioaktivnost) u izmetu treba određivati svakodnevno počevši s 24 h nakon primjene doze pa do završetka studije, osim ako pilot studije ne sugeriraju druge ili dodatne vremenske točke za skupljanje. Treba pružiti argumentaciju za drukčiji raspored skupljanja.

49. Skupljanje izdahnutog CO_2 i drugih hlapljivih materijala može se prekinuti u pokusu predmetne studije ako je u izdahnutom zraku tijekom razdoblja skupljanja od 24 h pronađeno manje od 1 % primijenjene doze.

Studije s vremenskim tijekom

Kinetika plazme/krvi

50. Svrha je ovih studija dobiti procjenu osnovnih parametara TK [npr. C_{max}, T_{max} poluvrijeme ($t_{1/2}$), AUC] za ispitivanu kemikaliju. Te se studije mogu provoditi sa samo jednom dozom ili bolje s još dvjema dozama. Namještanje doza treba odrediti na temelju naravi pokusa i/ili ciljanog problema. Za rješavanje problema kao što su bioraspoloživost ispitivane kemikalije i/ili za pojašnjenje učinka doze na klirens (npr. za pojašnjenje je li klirens zasićen u obliku koji ovisi o dozi) mogu biti potrebni kinetički podaci.

51. Za te studije treba primijeniti najmanje četiri životinje jednog spola po skupini koja prima dozu. Treba pružiti obrazloženje za spol upotrijebljenih životinja. Primjenu obaju spolova (četiri mužjaka i četiri ženke) treba uzeti u obzir ako postoji dokaz o značajnim razlikama u toksičnosti povezanima sa spolom.

▼M4

52. Nakon primjene ispitivane kemikalije (radioaktivno obilježene) u odgovarajućim vremenskim točkama od svake životinje treba uzeti uzorke krvi uz primjenu prikladne metode uzorkovanja. Količina i broj uzoraka krvi koji se mogu dobiti po životinji može biti ograničena potencijalnim učincima ponovljenog uzorkovanja ili zdravlja/fiziologije životinje i/ili osjetljivosti analitičke metode. Treba analizirati uzorke za svaku pojedinačnu životinju. U nekim okolnostima (npr. karakterizacija metabolita) također može biti potrebno udruživanje uzoraka više od jedne životinje. Udružene uzorke treba jasno identificirati te pružiti objašnjenje za udruživanje. Ako se primjenjuje radioaktivno obilježena ispitivana kemikalija, može biti prikladna analiza ukupne radioaktivnosti. Ako je tako, treba analizirati ukupnu radioaktivnost u cijelom tijelu i plazmi ili plazmi i crvenim krvnim tjelešcima kako bi se omogućio izračun omjera krvi i plazme. U drugim okolnostima mogu biti potrebne specifičnije pretrage koje zahtijevaju identifikaciju početnog spoja i/ili metabolita ili određivanje proteinskih veza.

Kinetika drugih tkiva

53. Svrha ovih studija jest dobivanje informacija o vremenskom tijeku kako bi se pristupilo pitanjima u svezi s problemima, kao što su toksični način djelovanja, bioakumulacija i biopostojanost putem određivanja razina ispitivane kemikalije u raznim tkivima. Odabir tkiva i broj vrednovanih vremenskih točaka ovisit će o problemu kojemu se pristupa i toksikološkoj bazi podataka za ispitivanu kemikaliju. Plan tih studija kinetike dodatnih tkiva treba uzeti u obzir informacije skupljene kao što je opisano u stavcima 37. - 40. Te studije mogu uključivati jednu dozu ili ponovljene doze. Treba podnijeti detaljnu argumentaciju za pristup.

54. Razlozi za obavljanje studija kinetike drugih tkiva mogu uključivati:

— dokaz o produženom poluvijeku krvi, koji sugerira moguću akumulaciju ispitivane kemikalije u raznim tkivima ili

— zanimanje u ispitivanju je li postignuta razina stabilnog stanja u specifičnim tkivima (npr. u studijama uz primjenu ponovljene doze iako nije postignuta očita razina stabilnog stanja ispitivane kemikalije, može postojati zanimanje za utvrđivanje je li razina stabilnog stanja postignuta i u dobivenim tkivima meti).

55. Za ove tipove studija vremenskog tijeka odgovarajuću oralnu dozu ispitivane kemikalije treba primijeniti na najmanje četirima životinjama po dozi po vremenskoj točki te tijekom vremena distribucije koje se nadzire u odabranim tkivima. Može se upotrijebiti samo jedan spol osim ako se ne uoči specifična toksičnost u nekom spolu. Hoće li se analizirati ukupna radioaktivnost ili početni spoj i/ili metaboliti također ovisi o problemu kojemu se pristupa. Distribucija u tkivu treba se odrediti primjenom odgovarajućih tehnika.

Indukcija/inhibicija enzima

56. Studije usmjerena na moguće učinke indukcije/inhibicije enzima ili biotransformaciju ispitivane kemikalije na kojoj se vrši studija mogu biti potrebne u jednom ili više od sljedećih slučajeva:

1. Raspoloživ dokaz koji ukazuje na odnos između biotransformacije ispitivane kemikalije i povećane toksičnosti,

2. Raspoloživi podaci o toksičnosti koji ukazuju na nelinearan odnos između doze i metabolizma,

▼M4

3. Rezultati studija identifikacije metabolita pokazuju identifikaciju potencijalnog toksičnog metabolita koji je možda proizveden enzimskim tijekom koji je inducirala ispitivana kemikalija,

4. Pri objašnjavanju učinaka za koje se pretpostavlja da su povezani s fenomenom indukcije enzima,

5. Ako se u metaboličkom profilu ispitivane kemikalije opaze toksikološki značajne promjene bilo u pokusima *in vitro* ili *in vivo* s različitim vrstama ili uvjetima, može biti potrebna karakterizacija uključenog(ih) enzima (npr. enzimi faze I enzimi kao što su izoenzimi sustava monooksigenaze koji ovise o Citokromu P450, enzimi faze II kao što su izoenzimi sulfotransferaze ili uridin difosfat glukuronozil transferaza ili bilo koji drugi relevantni enzimi). Ta se informacija može upotrijebiti za vrednovanje odnosa vrsta s ekstrapolacijom vrsta.

57. Treba primijeniti odgovarajuće, prikladno ocijenjene i obrazložene protokole studija za vrednovanje promjena u TK povezanih s ispitivanom kemikalijom. Planovi studija kao primjer sastoje se od primjene ponavljanih doza s neoznačenom ispitivanom kemikalijom, nakon čega slijedi jedna radioaktivno obilježena doza 14. dana ili primjena ponavljanih doza s radioaktivno obilježenom ispitivanom kemikalijom te uzorkovanja 1., 7. i 14. dana radi određivanja profila metabolita. Primjena ponavljanih doza s radioaktivno obilježenom ispitivanom kemikalijom također može pružiti informacije o bioakumulaciji (vidjeti stavak 26.).

DODATNI PRISTUPI

58. Dodatni pristupi, osim pokusa *in vivo* opisanih u ovoj ispitnoj metodi, mogu pružiti korisne informacije o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu ili eliminaciji ispitivane kemikalije u određenih vrsta.

Primjena informacija *in vitro*

59. U studijama *in vitro* uz primjenu odgovarajućih sustava ispitivanja može se pristupiti nekolicini pitanja u svezi s metabolizmom ispitivane kemikalije. Svježe izolirani ili uzgojeni hepatociti i substanične frakcije (npr. mikrosomi i citosol ili frakcija S9) iz jetre mogu se upotrijebiti u studiji mogućih metabolita. Lokalni metabolizam u organu meti, npr. plućima, može biti koristan za procjenu rizika. U te svrhe mogu biti korisne mikrosomalne frakcije tkiva meta. Studije s mikrosomima mogu biti korisne za pristup potencijalnim razlikama i spolu i životnom stadiju te karakterizirati parametre enzima (K_m i V_{max}) koji mogu pomoći u određivanju ovisnosti doze o metabolizmu u odnosu na razine izlaganja. Mikrosomi uz to mogu biti korisni za identifikaciju specifičnih mikrosomalnih enzima uključenih u metabolizam ispitivane kemikalije, što može biti relevantno u ekstrapolaciji vrsta (vidjeti još i stavak 56.). Potencijal indukcije biotransformacije također se može ispitati uz primjenu jetrenih substaničnih frakcija (npr. mikrosoma i citosola) životinja koje su prethodno tretirane ispitivanom kemikalijom, *in vitro* pomoću studija o indukciji hepatocita ili iz specifičnih staničnih linija koje pokazuju relevantne enzime. U određenim okolnostima i u odgovarajućim uvjetima substanične frakcije iz ljudskih tkiva također se mogu uzeti u obzir za određivanje potencijalnih razlika u biotransformaciji među vrstama. Rezultati istraživanja *in vitro* također mogu biti korisni u razvoju modela PBTK (5).

▼M4

60. Studije o dermalnoj apsorpciji *in vitro* mogu pružiti dodatne informacije za karakterizaciju apsorpcije (6).

61. Za pristup sličnim pitanjima mogu se upotrijebiti primarne stanične kulture stanica jetre i svježi presjeci tkiva te mikrosomi iz jetre. U određenim slučajevima na specifična se pitanja može odgovoriti uporabom staničnih linija s definiranom ekspresijom relevantnog enzima ili proizvedenih staničnih linija. U određenim slučajevima može biti korisno istražiti inhibiciju i indukciju izoenzima specifičnog citokroma P450 (npr. CYP1A1, 2E1, 1A2 i drugih) i/ili enzima faze II pomoću početnog spoja uz primjene studija *in vitro*. Dobivene informacije mogu biti korisne za spojeve slične strukture.

Uporaba podataka o toksikokinetici iz studija o toksičnosti kao dodatnih informacija

62. Analiza uzoraka krvi, tkiva i/ili izlučevina dobivenih tijekom provođenja drugih studija toksičnosti mogu pružiti podatke o bioraspoloživosti, promjenama u koncentraciji plazme tijekom vremena (AUC, C_{max}), potencijalu bioakumulacije, klirensu te promjenama u metabolizmu i kinetici ovisno o spolu ili životnom stadiju.

63. Razmatranja o planiranju studije mogu se primijeniti za odgovor na pitanja u vezi sa: zasićenjem apsorpcije, tijekom biotransformacije ili ekskrecije na visokim razinama doze; djelovanjem novih metaboličkih tijekova na višim dozama i ograničenjem toksičnih metabolita na više doze.

64. Ostala razmatranja o određivanju opasnosti mogu obuhvaćati probleme kao što su:

— Osjetljivost povezana s dobi zbog razlika u statusu barijere krv-mozak, kapaciteta bubrega i/ili detoksikacije,

— Subpopulacijska osjetljivost zbog razlika u kapacitetu biotransformacije ili drugim TK razlikama,

— Opseg izlaganja fetusa transplacentarnim transferima ili kemikalijama ili novog mladunčeta laktacijom.

Primjena toksikokinetičkog modeliranja

65. Toksikokinetički modeli mogu biti korisni za razne aspekte procjene opasnosti i rizika, kao primjerice u predviđanju sistemskog izlaganja i interne doze u tkivu. Osim toga, može se pristupiti specifičnim pitanjima o načinu djelovanja, a ti modeli mogu pružiti temelj za ekstrapolaciju vrsta, načina izlaganja, uzoraka doziranja i procjene rizika za ljude. Podaci korisni za razvoj modela PBTK za ispitivanu kemikaliju u svim danim vrstama obuhvaćaju 1) koeficijente razdjeljenja, 2) biokemijske konstante i fiziološke parametre, 3) parametre specifične za način izlaganja te 4) *in vivo* kinetičke podatke za ocjenu modela [npr. parametre klirensa za relevantne (> 10 %) tijekove ekskrecije, K_m i V_{max} za metabolizam]. Pokusne podatke upotrijebljene u razvoju modela treba proizvesti znanstveno opravdanim metodama i treba ocijeniti rezultate modela. Parametri specifični za ispitivanu kemikaliju i vrstu, kao što su brzina apsorpcije, parcioniranje krvi u tkivu i konstanta brzine metabolizma, često se određuju kako bi se olakšao razvoj modela za neodjeljke ili modela utemeljenog na fiziologiji (7).

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

66. Preporučuje se da se izvješće o studiji obuhvaća i sadržaj.

Tijelo izvješća

67. U tijelu izvješća moraju se nalaziti informacije pokrivene ovom ispitnom metodom, organizirane u odjeljke i odlomke na sljedeći način:

Sažetak

68. Ovaj odjeljak izvješća o studiji treba obuhvaćati sažetak plana studije te opis korištenih metoda. Također, mora istaknuti ključne nalaze što se tiče bilance mase, naravi i magnitude metabolita, ostataka u tkivu, klirensa, potencijala bioakumulacije, razlika među spolovima itd. Sažetak treba predstaviti s dovoljno detalja kako bi se omogućilo vrednovanje nalaza.

Uvod

69. Ovaj odjeljak izvješća treba obuhvaćati ciljeve studije, razloge i plan te odgovarajuće reference i pozadinsku povijest.

Materijali i metode

70. Ovaj odjeljak izvješća treba obuhvaćati detaljan opis svih primjerenih informacija kao što su:

(a) Ispitivana kemikalija

Ovaj pododjeljak treba obuhvaćati identifikaciju ispitivane kemikalije: kemijski naziv, molekularnu strukturu, kvalitativno i kvantitativno određenje njezina kemijskog spoja, kemijsku čistoću te, ako je moguće, tip i količinu nečistoća. Također treba obuhvaćati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući fizikalno stanje, boju, makroskopsku topljivost i/ili koeficijent razdjeljenja, stabilnost te po potrebi korozivnost. Ako je primjenjivo, treba pružiti informacije o izomerima. Ako je ispitivana kemikalija radioaktivno obilježena, u ovaj pododjeljak treba uključiti sljedeće informacije: tip radioaktivnih nuklida, položaj oznake, specifičnu aktivnost te radiokemijsku čistoću.

Treba navesti tip opisa svih nosača, diluensa, sredstava za suspenziju i emulgatora ili drugih materijala korištenih u primjeni ispitivane kemikalije.

(b) Pokusne životinje

Ovaj pododjeljak treba obuhvaćati informacije o pokusnim životinjama, uključujući odabir i obrazloženje za vrstu, soj i starost na početku studije, spol i tjelesnu masu, zdravstveni status te uzgoj životinja.

(c) Metode

Ovaj pododjeljak treba obuhvaćati detalje o planu studije i korištenoj metodologiji. Treba uključivati opis:

1. Obrazloženje za sve modifikacije načina izlaganja i uvjeta izlaganja, ako je primjenjivo,

▼M4

2. Obrazloženje za odabir visina doze,

3. Opis pilot studija korištenih u planiranju pokusa sljedećih studija, ako je primjenjivo. Treba navesti podatke iz pilot studija koji služe kao podrška,

4. Kako je pripremana otopina doze te tip korištenog otapala ili nosača, ako je neki korišten,

5. Broj tretiranih skupina i broj životinja po skupini,

6. Visine i količine doza (te specifičnu aktivnost doze ako je korištena radioaktivnost),

7. Način(i) i metode primjene,

8. Učestalost doziranja,

9. Razdoblje posta (ako je primijenjeno),

10. Ukupna radioaktivnost po životinji,

11. Postupanje sa životinjama,

12. Skupljanje uzoraka i manipulacija uzorcima,

13. Analitičke metode korištene za odvajanje, kvantitaciju i identifikaciju metabolita,

14. Granica detekcije korištenih metoda,

15. Druga korištena pokusna mjerenja i postupci (uključujući i ocjenu metoda za analizu metabolita).

(d) Statistička analiza

Ako se za analizu nalaza studije koristi statistička analiza, treba obuhvatiti dovoljno informacija o metodi analize i korištenom računalnom programu tako da neovisni revizor/statističar može ponovno vrednovati i rekonstruirati analizu.

U slučaju studije za modeliranje sustava, kao što je PBTK, predstavljanje modela treba obuhvaćati potpun opis modela kako bi se omogućila neovisna rekonstrukcija i ocjena modela (vidjeti stavak 65. i Dodatak: Definicije).

Rezultati

71. Sve podatke treba sažeti i tablično prikazati s odgovarajućim statističkim vrednovanjem te opisati u tekstu ovog odjeljka. Podatke o radioaktivnosti treba sažeti i prikazati ako je potrebno za studiju, obično kao mikrogramske ili miligramske ekvivalente po jedinici uzorka iako se mogu upotrijebiti i druge jedinice. Ovaj odjeljak treba obuhvaćati grafičke ilustracije nalaza, reprodukciju reprezentativnih kromatografskih i spektrometrijskih podataka, identifikaciju/kvantifikaciju metabolita i predložene metaboličke tijekove uključujući molekularnu strukturu metabolita. Treba obuhvatiti i sljedeće informacije, ako je primjenjivo:

1. Količinu i postotak rekuperacije radioaktivnosti u urinu, izmetu, izdahnutom zraku te ispiranje kaveza od urina i izmeta.

— Za dermalne studije također obuhvatite i podatke o rekuperaciji ispitivane kemikalije iz tretirane kože, ispiraka kože te ostataka radioaktivnosti u aparatu koji pokriva kožu i metaboličkoj jedinici, kao i rezultate studije dermalnog ispiranja. Za ostale rasprave vidjeti stavke 74. - 77.

▼M4

— Za inhalacijske studije također obuhvatite i podatke o rekuperaciji ispitivane kemikalije iz plućnog i nazalnog tkiva (8). Za ostale rasprave vidjeti stavak 78.

2. Distribucija u tkivu navedena kao postotak primijenjene doze i koncentracije (mikrogramski ekvivalent po gramu tkiva) i omjer tkiva i krvi ili tkiva i plazme,

3. Bilanca materijala razvijena iz svake studije koja obuhvaća analizu tjelesnih tkiva i izlučevina,

4. Koncentracije plazme i toksikokinetički parametri (bioraspoloživost, AUC, Cmax, Tmax, klirens, polutijek) nakon primjene relevantnim načinom/načinima izlaganja,

5. Brzina i opseg apsorpcije ispitivane kemikalije nakon primjene relevantnih načinom/načinima izlaganja,

6. Količine ispitivane kemikalije i metabolita (navedenih kao postotak primijenjene doze) skupljenih u izlučevinama,

7. Reference na podatke iz dodatka koji sadrže pojedinačne podatke o životinjama za sva mjerenja konačnih učinaka (npr. primjena doze, postotak rekuperacije, koncentracije, TK parametre itd.),

8. Slika s predloženim metaboličkim tijekovima i molekularnim strukturama metabolita.

Rasprava i zaključci

72. Autor u ovom odjeljku treba:

1. Pružiti predloženi metabolički tijek utemeljen na rezultatima metabolizma i dispozicije ispitivane kemikalije,

2. Raspravljati o svim potencijalnim razlikama između vrsta i spolova po pitanju dispozicije i/ili biotransformacije ispitivane kemikalije,

3. Tablično prikazati i raspravljati o identifikaciji i magnitudi metabolita, klirensu, potencijalu bioakumulacije te razini ostataka početnog spoja i/ili metabolita u tkivu, kao i o mogućim promjenama u TK parametrima koje ovise o dozi, ako je potrebno,

4. U ovaj odjeljak treba integrirati sve relevantne TK podatke dobivene tijekom provođenja studije toksičnosti,

5. Pružiti sažet zaključak koji se može poduprijeti nalazima studije,

6. Dodati odjeljke (ako je potrebno ili prikladno).

73. Dodatni odjeljci trebaju se upotrijebiti kako bi se uključile dodatne bibliografske informacije, tablice, slike, dodaci itd.

▼M4

ALTERNATIVNI NAČINI IZLAGANJA

Dermalni

Dermalni tretman

74. U ovom odjeljku nalaze se specifične informacije o istraživanju toksikokinetike ispitivane kemikalije dermalnim putem. Za dermalnu apsorpciju treba proučiti poglavlje B.44 ovog Priloga [Apsorpcija putem kože: metoda *in vivo* (9)]. Za ostale konačne učinke, kao što su distribucija i metabolizam, može se primijeniti ispitna metoda B.36. Pri dermalnom tretmanu treba se upotrijebiti jedna ili više visina doza za ispitivanu kemikaliju. Ispitivana kemikalija (npr. čisti, razrijeđeni ili formulirani materijal koji sadrži ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje na kožu) mora biti jednaka (ili realističan surogat) kemikaliji kojoj mogu biti izloženi ljudi ili druge potencijalne vrste meta. Visinu/e doza treba odabrati u skladu sa stavcima 20. - 26. ove ispitne metode. Čimbenici koji se mogu uzeti u obzir pri odabiru dermalne doze uključuju očekivano ljudsko izlaganje i/ili doze na kojima je u drugim studijama dermalne toksičnosti opažena toksičnost. Dermalnu dozu/dermalne doze treba razrijediti, po potrebi, u prikladnom nosaču te primijeniti u količini prikladnoj za davanje doze. Krzno kratko prije ispitivanja treba štipaljkama učvrstiti tako da se ukloni s dorzalnog područja trupa pokusnih životinja. Može se obaviti brijanje, ali to se mora obaviti otprilike 24 h prije ispitivanja. Pri učvršćivanju krzna štipaljkama ili brijanju treba paziti da se ne ošteti koža jer bi to moglo promijeniti njezinu propusnost. Otprilike 10 % površine tijela treba očistiti radi primjene ispitivane kemikalije. U slučaju kemikalija visoke toksičnosti površina može biti manja od 10 %, ali što više površine treba biti pokriveno tankim i ravnomjernim slojem. Za sve ispitivane skupine treba primijeniti jednak tretman površine. Dozirna područja treba zaštititi prikladnom zaštitom osiguranom protiv micanja. Životinje treba smjestiti odvojeno.

75. Studiju s primjenom dermalnog ispiranja treba provesti kako bi se odredila količina primijenjene doze ispitivane kemikalije koja se može ukloniti s kože ispiranjem tretiranog područja blagim sapunom i vodom. Ta studija također može pomoći pri utvrđivanju bilance mase ako se ispitivana kemikalija primjenjuje dermalnim putem. Za tu studiju s primjenom dermalnog ispiranja jednu dozu ispitivane kemikalije treba dati dvjema životinjama. Odabir visine doze u skladu je sa stavkom 23. ove ispitne metode (vidjeti još i stavak 76. za raspravu o vremenu kontakta s kožom). Treba odrediti količine rekuperirane ispitivane kemikalije u ispircima kako bi se odredila učinkovitost uklanjanja ispitivane kemikalije pranjem.

76. Osim ako to korozivnost ne dopusti, ispitivanu kemikaliju treba primijeniti i zadržati na koži najmanje 6 sati. U trenutku uklanjanja zaštite tretirano područje treba isprati pridržavajući se postupka izloženog u studiji uz primjenu dermalnog ispiranja (vidjeti stavak 75.). I zaštitu i ispirke treba analizirati na ostatke ispitivane kemikalije. Na završetku studije sve životinje treba humano usmrtiti u skladu s (2) te ukloniti tretiranu kožu. Odgovarajuću sekciju tretirane kože treba analizirati kako bi se odredili ostaci ispitivane kemikalije (radioaktivnost).

77. Za toksikokinetičko određivanje lijekova mogu biti potrebni različiti postupci u skladu s odgovarajućim regulatornim sustavom.

▼**M4**

Inhalacija

78. Treba primijeniti jednu koncentraciju (ili više ako je potrebno) ispitivane kemikalije. Koncentraciju/e treba odabrati u skladu sa stavcima 20. - 26. ove ispitne metode. Inhalacijske tretmane treba provoditi uz primjenu aparature „glava rakete" ili „samo glava" kako bi se spriječila apsorpcija drugim načinima izlaganja (8). Ako se primjenjuju drukčiji uvjeti za inhalaciju, treba dokumentirati obrazloženje za modifikaciju. Treba definirati trajanje izlaganja inhalacijom. Tipično izlaganje traje 4 - 6 sati.

LITERATURA

1. OECD (2009.). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Pariz.

2. OECD (2000.). Guidance Document on 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 N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Pariz.

3. Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

4. Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

5. Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

6. Poglavlje B.45 ovog Priloga, Apsorpcija putem kože: metoda *in vitro*.

7. IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

9. Poglavlje B.44 ovog Priloga, Apsorpcija putem kože: metoda *in vivo*.

10. Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

11. Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatak

DEFINICIJE

Apsorpcija: proces(i) preuzimanja kemikalije u tkiva ili kroz tkiva. Apsorpcija se odnosi na početni spoj i sve njegove metabolite. Ne treba je pomiješati s ‚bioraspoloživošću'.

Akumulacija (bioakumulacija): povećanje količine ispitivane kemikalije tijekom vremena u tkivima (obično u masnim tkivima nakon ponovljenog izlaganja). Ako je unos ispitivane kemikalije u tijelo veći od stope eliminacije, organizam akumulira ispitivanu kemikaliju i mogu se postići toksične koncentracije ispitivane kemikalije.

ADME: kratica za apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju (‚Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion').

AUC: (područje ispod krivulje koncentracije plazme i vremena): područje ispod krivulje u dijagramu koncentracije ispitivane kemikalije u plazmi tijekom vremena. Predstavlja ukupnu količinu ispitivane kemikalije koju tijelo apsorbira tijekom unaprijed određenog vremenskog razdoblja. Pod linearnim uvjetima AUC (od početka vremena do beskonačnosti) je proporcionalan ukupnoj količini ispitivane kemikalije koju je tijelo apsorbiralo, bez obzira na stopu apsorpcije.

Autoradiografija: (autoradiografija cijelog tijela): primjenjuje se za kvalitativno i/ili kvantitativno određivanje mjesta radioaktivne ispitivane kemikalije. Ova se tehnika koristi filmom s X-zrakama ili novije digitalnim radiološkim prikazom uz pomoć fosfora kako bi vizualizirala radioaktivno obilježene molekule ili fragmente molekula bilježenjem zračenja koje emitiraju u predmetu koji se istražuje. Kvantitativna autoradiografija cijelog tijela u usporedbi sa seciranjem organa može imati neke prednosti za ocjenu distribucije ispitivane kemikalije i utvrđivanje ukupne rekuperacije i razlučivanja radioaktivnog materijala u tkivima. Značajna je prednost, primjerice, što se može primijeniti na modelu pigmentiranih životinja radi utvrđivanja mogućih asocijacija ispitivane kemikalije s melaninom koji može vezati određene molekule. No, iako može pružiti pogodne preglede veznih mjesta niskog afiniteta i visokog kapaciteta u cijelom tijelu, ova tehnika može biti ograničena u prepoznavanju specifičnih mjesta meta kao što su vezna mjesta receptora, gdje je za određivanje potrebna relativno visoka rezolucija i velika osjetljivost. Kada se primjenjuje autoradiografija, pokusi s ciljem određivanja bilance mase primijenjenog spoja moraju se provoditi kao odvojena skupina ili u studiji odvojenoj od pokusa distribucije u tkivu, gdje su sve izlučevine (koje mogu obuhvaćati i izdahnuti zrak) i cijela trupla homogenizirana i određena tekućinskim scintilacijskim brojanjem.

Žučno izlučivanje: izlučivanje putem žučnih kanala.

Bioakumulacija: vidjeti ‚akumulacija'.

Bioraspoloživost: dio primijenjene doze koja postiže sistemsku cirkulaciju ili je dostupna na mjestu fiziološke aktivnosti. Bioraspoloživost ispitivane kemikalije obično se odnosi na početni spoj, ali se može odnositi i na njegov metabolit. U obzir se uzima samo na jedan kemijski oblik. *Nota bene:* bioraspoloživost i apsorpcija nisu isto. Razlika između npr. oralne apsorpcije (tj. prisutnosti u stijenci crijeva i portalnoj cirkulaciji) i bioraspoloživosti (tj. prisutnosti u sistemskoj krvi i tkivima) može nastati kemijskim raspadanjem zahvaljujući metabolizmu stijenke crijeva ili transportu odljevom natrag u šupljinu crijeva ili presistemski metabolizam u jetri između ostalih čimbenika (10). Bioraspoloživost toksične komponente (početni spoj ili metabolit) ključni je parametar u procjeni rizika za ljude (ekstrapolacija visoke do niske doze, ekstrapolacija između načina primjene) za izvođenje interne vrijednosti iz ekstremnih NOAEL ili BMD (primijenjena doza). Za učinke na jetru nakon oralne primjene dovoljna je oralna apsorpcija. No za svaki učinak, osim onog na ulazu, bioraspoloživost je općenito pouzdaniji parametar za daljnju uporabu u procjeni rizika od apsorpcije.

▼M4

Biopostojanost: vidjeti ‚postojanost'.

Biotransformacija: (obično enzimska) kemijska konverzija ispitivane kemikalije u drugu kemikaliju unutar tijela. Sinonim za ‚metabolizam'.

C_{max}: maksimalna (vršna) koncentracija u krvi (plazmi/serumu) nakon primjene ili maksimalna (vršna) ekskrecija (u urinu ili izmetu) nakon primjene.

Klirens: kvantitativno mjerenje brzine kojom se ispitivana kemikalija uklanja iz krvi, plazme ili određenog tkiva u jedinici vremena.

Odjeljak: strukturalni ili biokemijski dio (ili jedinica) tijela, tkiva ili stanice, koji je odvojen od ostatka.

Tijek detoksikacije: niz koraka koji dovode do eliminacije toksičnih kemikalija iz tijela, bilo metaboličkom izmjenom ili izlučivanjem.

Distribucija: raspršenje ispitivane kemikalije i njezinih derivata kroz organizam.

Enzimi/izozimi: proteini koji kataliziraju kemijske reakcije. Izozimi i enzimi koji kataliziraju slične kemijske reakcije, ali se razlikuju po svojem aminokiselinskom slijedu.

Enzimski parametri: K_m: Michaelisova konstanta i V_{max}: maksimalna brzina.

Ekskrecija: proces(i) kojim(a) se primijenjena ispitivana kemikalija i/ili njezini metaboliti uklanjanju iz tijela.

Egzogeno: uvedeno izvana ili proizvedeno izvan organizma ili sustava.

Ekstrapolacija: utjecaj jedne ili više nepoznatih vrijednosti na temelj onoga što je poznato ili što se promatra.

Poluvrijeme ($t_{1/2}$): vrijeme potrebno za koncentraciju ispitivane kemikalije da se u odjeljku smanji za pola. Obično se odnosi na koncentraciju plazme ili količinu ispitivane kemikalije u cijelom tijelu.

Indukcija/indukcija enzima: sinteza enzima kao odgovor na stimulans iz okoliša ili induktorsku molekulu.

Linearnost/linearna kinetika: proces je linearan po pitanju kinetike ako su sve brzine transfera između odjeljaka proporcionalne količini prisutnih koncentracija, tj. prvom redu. Posljedično su konstantni klirens i količine distribucije te poluvijeka. Postignute su koncentracije proporcionalne brzini doziranja (izlaganja) te se lakše predviđa akumulacija. Linearnost/nelinearnost se može utvrditi usporedbom relevantnih parametara, npr. AUC nakon izlaganja različitim dozama ili nakon jednog i ponovljenog izlaganja. Nedostatak ovisnosti može biti indikativan za zasićenje enzima uključenih u metabolizam spoja, povećanje AUC nakon ponovljenog izlaganja u usporedbi s jednim izlaganjem može biti indikacija za inhibiciju metabolizma, a smanjenje u AUC može biti indikacija za indukciju metabolizma [vidjeti i (11)].

Bilanca mase: izračun ulaza ispitivane kemikalije u sustav i njezina izlaza iz sustava.

▼M4

Bilanca materijala: vidjeti ‚bilanca mase'.

Mehanizam (način) toksičnosti/mehanizam (način) djelovanja: mehanizam djelovanja odnosi se na specifične biokemijske interakcije kroz koje ispitivana kemikalija proizvodi svoj učinak. Način djelovanja odnosi se na općenitije tijekove koji izazivaju toksičnost ispitivane kemikalije.

Metabolizam: sinonim za ‚biotransformaciju'.

Metaboliti: proizvodi metabolizma ili metaboličkih procesa.

Oralna apsorpcija: postotak doze ispitivane kemikalije apsorbirane na mjestu davanja (npr. GI trakt). Ovaj ključni parametar može se upotrijebiti za razumijevanje frakcije primijenjene ispitivane kemikalije koja dolazi do portalne vene te zatim jetre.

Koeficijent razdjeljenja: poznat i kao koeficijent distribucije, predstavlja mjeru diferencijalne topljivosti kemikalije u dvama otapalima.

Vršne razine krvi (plazma/serum): maksimalna (vršna) koncentracija krvi (plazma/serum) nakon davanja (vidjeti i ‚C_{max}').

Postojanost (biopostojanost): dugoročna prisutnost kemikalije (u biološkom sustavu) zbog otpornosti na degradaciju/eliminaciju.

Analogno predviđanje (read-across): informacija o konačnom učinku za jednu ili više kemikalija upotrebljava se za predviđanje konačnog učinka za ciljanu kemikaliju.

Mikroskopska autoradiografija receptora (ili mikroautoradiografija receptora): ova se tehnika može primjenjivati za temeljito ispitivanje ksenobiotičke interakcije sa specifičnim tkivima ili populacijama stanica kao što su na primjer u studijama receptorskih veza ili specifičnog načina djelovanja koja mogu zahtijevati visoku rezoluciju i visoku osjetljivost koja se ne može postići drugim tehnikama, kao što je autoradiografija cijelog tijela.

Način primjene (oralno, IV, dermalno, inhalacija itd.): odnosi se na način kojim se kemikalije daju u tijelo (npr. oralno sondom, oralno prehranom, dermalno, inhalacijom, intravenozno itd.).

Zasićenje: stanje u kojem je jedan ili više kinetičkih procesa (npr. apsorpcija, metabolizam ili klirens) na maksimumu (čitaj ‚zasićen').

Osjetljivost: sposobnost metode ili instrumenta da razlikuje između reakcija na mjerenja uz predočenje različitih razina varijable koju se ispituje.

Razine krvi (plazma) u stabilnom stanju: stanje neravnoteže otvorenog sustava u kojem su sve sile, koje djeluju na sustav, točno uravnotežene suprotnim silama tako da su sve njegove komponente stacionarne u koncentraciji iako tvar prolazi sustavom.

Modeliranje sustava (toksikokinetika na bazi psihologije, na bazi farmakokinetike, farmakokinetika na bazi fiziologije, na bazi biologije itd.): Apstraktni model koji se za opis ponašanja sustava koristi matematičkim jezikom.

Tkivo meta: tkivo u kojem se manifestira glavni nepovoljni učinak ili toksikant.

▼M4

Ispitivana kemikalija: bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

Distribucija u tkivu: reverzibilno kretanje ispitivane kemikalije s jedne lokacije u tijelu do druge. Distribucija u tkivu može se istraživati seciranjem organa, homogenizacijom, izgaranjem i tekućinskim scintilacijskim brojanjem ili kvalitativnom i/ili kvantitativnom autoradiografijom cijelog tijela. Prvospomenuto je korisno za postizanje koncentracije i postotka rekuperacije iz tkiva i ostataka trupla istih životinja, ali može pokazati nedostatak za sva tkiva i može imati manje od idealne ukupne rekuperacije (< 90 %). Definiciju posljednjeg vidjeti gore.

T_{max}: vrijeme za postizanje C_{max}.

Toksikokinetika (farmakokinetika): istraživanje apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije kemikalija tijekom vremena.

Ocjena modela: postupak procjene prikladnosti modela za dosljedno opisivanje raspoloživih toksikokinetičkih podataka. Modeli se mogu vrednovati statističkom i vizualnom usporedbom predviđanja modela s pokusnim vrijednostima u odnosu na opću neovisnu varijablu (npr. vrijeme). Treba obrazložiti opseg vrednovanja u odnosu na namjeravanu primjenu modela.

▼B

B.37. **ODGOĐENA NEUROTOKSIČNOST ORGANOFOSPORNIH TVARI NAKON AKUTNOG IZLAGANJA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Kod procjene i vrednovanja toksičkih učinaka tvari važno je uzeti u obzir potencijal određenih klasa tvari da uzrokuju posebne tipove neurotoksičnosti koje možda nije moguće otkriti u drugim studijama toksičnosti. Za neke organofosforne tvari opaženo je da uzrokuju odgođenu neurotoksičnost pa bi trebale postati predmetom proučavanja.

Za utvrđivanje tvari koje mogu uzrokovati odgođenu polineuoropatiju mogu se upotrijebiti *in vitro* testovi probira; međutim, negativni nalazi *in vitro* studija nisu dokaz da ispitivana tvar nije neurotoksična.

Vidjeti Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Organofosforne tvari obuhvaćaju organofosforne estere bez naboja, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosfonske ili organofosforamidne kiseline ili srodne fosforotio, fosfonotio ili fosforotioamidne kiseline, ili druge tvari koje mogu uzrokovati odgođenu neurotoksičnost koje se ponekad vide u toj klasi tvari.

Odgođena neurotoksičnost je sindrom koji se povezuje s produženim odgođenim vremenom prve pojave ataksije, distalnih aksonopatija u leđnoj moždini i perifernom živcu, i inhibiciju i starenje esteraze koja je povezana s neuropatskim djelovanjem organofosfornih spojeva (neuropathy target esterase — NTE) u neuralnom tkivu.

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentna tvar može se ispitati s pozitivnom kontrolnom skupinom te na taj način dokazati da se u laboratorijskim ispitnim uvjetima reakcija ispitivanih vrsta nije značajno promijenila,.

Tri-o-tolil fosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5. CAS nomenklatura: fosforna kiselina, tris(2metilfenil)ester) primjer je neurotoksične tvari široke uporabe, poznate i kao tris-o-kresilfosfat.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar daje se oralno u jednoj dozi domaćim kokošima koje su po potrebi zaštićene od akutnih kolinergičkih učinaka. Životinje se opažaju 21 dan s obzirom na anomalije u ponašanju, ataksiju i paralizu. Biokemijska mjerenja, posebno inhibicija esteraze koja je povezana s neuropatskim djelovanjem organofosfornih spojeva (NTE), provode se na kokošima koje su nasumice odabrane iz svake skupine, obično 24 i 48 sati nakon tretiranja. Dvadeset jedan dan nakon izlaganja, preostali broj kokoši se usmrti i provede se histopatološka pretraga odabranog neuralnog tkiva.

▼B

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Pripreme**

Zdrave mlade odrasle kokoši bez virusnih oboljenja koja bi mogla utjecati na istraživanje, koje ne primaju nikakve lijekove i ne pokazuju nepravilnosti u hodu treba nasumice odabrati i svrstati u tretiranu i kontrolnu skupinu, te prilagođavati laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana prije početka studije.

Treba koristiti kaveze ili ograđeni prostor dovoljne veličine da se kokošima omogući slobodno kretanje, te se treba koristiti lako opažanje hoda.

Doziranje ispitivane tvari obično se provodi oralno, sondom, želatinskim kapsulama, ili nekom usporedivom metodom. Tekućine se mogu davati nerazrijeđene ili otopljene u odgovarajućem otapalu kao što je kukuruzno ulje; ako je moguće, krute tvari treba otopiti jer apsorpcija velikih doza krute tvari u želatinskim kapsulama može biti nedovoljno učinkovita. Za sve nosače i otapala osim vode, toksičke karakteristike moraju biti poznate, a ako nisu, treba ih utvrditi prije ispitivanja.

1.5.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.5.2.1. *Ispitne životinje*

Preporuča se koristiti mlade odrasle domaće nesilice (*Gallus gallus domesticus*), stare do 12 mjeseci. Treba koristiti pasmine i sojeve standardne veličine i kokoši koje su odrasle u uvjetima koji su im omogućivali slobodno kretanje.

1.5.2.2. *Broj i spol*

Uz tretiranu skupinu, treba rabiti i kontrolnu skupinu za nosač i pozitivnu kontrolnu skupinu. Kontrolnu skupinu za nosač treba tretirati na identičan način kao i tretiranu skupinu, osim što se ispitivana tvar ne daje.

U svakoj skupini treba biti dovoljan broj kokoši kako bi ih se najmanje šest moglo usmrtiti za biokemijsku analizu (tri u svakoj od dvije vremenske točke), a šest može preživjeti 21-dnevno razdoblje opažanja patologije.

Pozitivna kontrolna skupina može se voditi istodobno, ili kao kontrolna skupina na temelju nedavnih iskustava. Ta skupina treba sadržavati najmanje šest kokoši tretiranih poznatom tvari s odgođenim neurotoksičkim djelovanjem, tri kokoši za biokemijsku analizu i tri kokoši za patologiju. Preporuča se periodično ažuriranje prethodno prikupljenih podataka. Ako laboratorij koji provodi ispitivanje mijenja neke od bitnih elemenata (npr. soj, prehranu, uvjete smještaja), treba razviti nove pozitivne kontrolne podatke.

▼B

1.5.2.3. *Visine doza*

Za utvrđivanje visine doze koja će se koristiti u glavnoj studiji treba provesti preliminarnu studiju u kojoj će se koristiti odgovarajući broj kokoši i skupina tretiranih različitim visinama doze. U preliminarnoj studiji obično je nužna određena smrtnost kako bi se odredila odgovarajuća doza za glavnu studiju. Međutim, za prevenciju smrti uslijed akutnih kolinergičkih učinaka, mogu se primijeniti atropin ili neki drugi zaštitni agens za koji je poznato da ne ometa odgođene neurotoksičke reakcije. Za procjenu maksimalne doze ispitivane tvari koja ne dovodi do smrtnosti može se upotrijebiti čitav niz ispitnih metoda (vidjeti metodu B.1.*bis*). U odabiru doze isto tako mogu biti korisni i ranije prikupljeni podaci o kokošima ili druge toksikološke informacije.

Visina doze ispitivane tvari u glavnoj studiji treba biti što je moguća viša uzimajući u obzir rezultate preliminarne studije za odabir doze i gornju granicu visine doze od 2 000 mg/kg tjelesne mase. Eventualna smrtnost do koje može doći ne bi smjela utjecati na preživljavanje dostatnog broja životinja za biokemijsku analizu (šest) i histološku analizu (šest) nakon 21 dan. Za prevenciju smrti uslijed akutnih kolinergičkih učinaka treba koristiti atropin ili neki drugi zaštitni agens za koji se zna da ne ometa odgođene neurotoksičke reakcije.

1.5.2.4. *Granični test*

Ako test pri visini doze od najmanje 2 000 mg/kg tjelesne mase/dan, uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne proizvede vidljive toksičke učinke i ako se na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima toksičnost ne očekuje, studija uz primjenu više doze može se smatrati nepotrebnom. Granični je test relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom više doze.

1.5.3. *Razdoblje opažanja*

Razdoblje opažanja treba biti 21 dan.

1.5.4. **Postupak**

Nakon primjene zaštitnog agensa kojim se sprečava smrt uslijed akutnog kolinergičkog učinka, ispitivana tvar daje se u jednoj dozi.

Opća opažanja

Opažanja trebaju početi odmah nakon izlaganja. Sve kokoši treba pomno opažati nekoliko puta tijekom prva dva dana, a zatim najmanje jednom dnevno tijekom razdoblja od 21 dan ili do planiranog usmrćenja. Treba bilježiti sve znakove toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, vrstu, ozbiljnost i trajanje anomalija u ponašanju. Ataksiju treba mjeriti na uobičajenoj ljestvici koja obuhvaća četiri razine, a paralizu treba zabilježiti. Najmanje dvaput tjedno kokoši odabrane za patologiju treba izvaditi iz kaveza i određeno vrijeme podvrgnuti prisilnoj motornoj aktivnosti, kao što je penjanje po ljestvama, čime će se olakšati opažanje minimalnih toksičnih učinaka. Životinje na umoru i životinje u stanju teške patnje ili bola treba ukloniti čim su uočene, humano usmrtiti i izvršiti nekropsiju.

▼B

Tjelesna masa

Sve kokoši treba vagati neposredno pred primjenu ispitivane tvari i najmanje jednom tjedno nakon toga.

Biokemijska analiza

Šest nasumice izabranih kokoši iz svake tretirane skupine i kontrolne skupine za nosač, i tri kokoši iz pozitivne kontrolne skupine (ako se ta skupina vodi istodobno), treba usmrtiti nekoliko dana nakon doziranja, a mozak i lumbarnu leđnu moždinu preparirati i procijeniti s obzirom na aktivnost inhibicije esteraze povezane s neuropatskim djelovanjem. Povrh toga, može biti korisno preparirati i analizirati tkivo bedrenog živca s obzirom na aktivnost inhibicije esteraze povezane s neuropatskim djelovanjem. Obično se po tri kokoši iz kontrolne i svake tretirane skupine usmrti nakon 24 sata, a tri nakon 48 sati, dok se po tri kokoši iz pozitivnih kontrolnih skupina usmrti nakon 24 sata. Ako opažanje kliničkih znakova intoksikacije (koja se često procjenjuje opažanjem vremena prve pojave kolinergičkih znakova) ukazuje na to da se toksični agens razgrađuje vrlo sporo, u tom slučaju možda je bolje uzorkovati tkivo iz tri kokoši dvaput u vremenu između 24 i tek 72 sata nakon doziranja.

Na tim uzorcima, ako se smatraju prikladnim, mogu se provoditi i analize acetilkolinesteraze (AChE). Međutim, do spontane reaktivacije AChE može doći *in vivo*, i time dovesti do podcijenjenog potencijala tvari kao inhibitora esteraze AchE.

Makroskopska nekropsija

Makroskopska nekropsija svih životinja (planirano usmrćenih i usmrćenih zato što su bile na umoru) treba obuhvatiti opažanje izgleda mozga i leđne moždine.

Histopatološki pregled

Živčano tkivo životinja koje su preživjele razdoblje opažanja i nisu upotrijebljene za biokemijske analize treba mikroskopski pregledati. Tkiva treba fiksirati *in situ*, tehnikama perfuzije. Sekcijom treba obuhvatiti *cerebellum* (srednju uzdužnu razinu), *medulla oblongata*, leđnu moždinu i periferne živce. Sekcije leđne moždine uzimaju se iz gornjeg cervikalnog segmenta, regije srednjeg toraksa i lumbo-sakralne regije. Treba uzeti sekcije distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana prema gastrocnemiusu, i sekcije bedrenog živca. Sekcije treba obojiti odgovarajućim bojilima za mijelin i aksone.

2. **PODACI**

Negativni rezultati analiza odabranih u ovoj metodi (biokemijske pretrage, histopatološke pretrage i opažanje ponašanja) u pravilu ne znače potrebu daljnjeg ispitivanja odgođene toksičnosti. Za dvosmislene rezultate ili rezultate iz kojih nije moguće proizvesti zaključke može biti potrebno dodatno vrednovanje.

Treba osigurati pojedinačne podatke. Dodatno, sve podatke treba sažeti u tablici u kojoj treba prikazati broj životinja u svakoj skupini na početku ispitivanja, broj životinja s lezijama, učincima na ponašanje ili biokemijskim učincima, tipove i ozbiljnost tih lezija ili učinaka te postotak životinja po vrsti i ozbiljnosti lezije ili učinka.

▼B

Nalaze ove studije treba vrednovati s obzirom na učestalost, ozbiljnost i korelaciju učinaka na ponašanje te biokemijskih i histopatoloških učinaka i eventualnih drugih opaženih učinaka kod tretiranih i kontrolnih skupina.

Numeričke rezultate treba vrednovati odgovarajućim opće prihvatljivim statističkim metodama. Odabir statističke metode koja će se koristiti obavlja se u okviru planiranja studije.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati slijedeće informacije:

3.1. Ispitne životinje:

— soj koji je upotrijebljen,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja itd.,

— pojedinačne mase životinja na početku istraživanja.

3.2. Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o pripremi ispitivane tvari, njezinoj stabilnosti i homogenosti, prema potrebi,

— opravdanost izbora nosača,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari,

— pojedinosti o kvaliteti vode i hrane,

— podloge za odabir visine doze,

— specifikacija primijenjenih doza, s uključenim podacima o nosaču, volumenu i fizičkom obliku u kojem je materijal primijenjen,

— identitet i pojedinosti o eventualnoj primjeni zaštitnog agensa.

3.3. Rezultati:

— podaci o tjelesnoj masi,

— podaci o toksičkoj reakciji po skupini, uključujući smrtnost,

— karakter, ozbiljnost i trajanje kliničkih opažanja (jesu li reverzibilna ili ne),

— iscrpan opis metoda i nalaza biokemijske analize,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis svih histopatoloških nalaza,

— prema potrebi, statistička obrada rezultata.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

Ova je metoda analogna Smjernici za ispitivanje OECD–a TG 418.

▼B

B.38. **STUDIJA ODGOĐENE NEUROTOKSIČNOSTI ORGANOFOSPORNIH TVARI – PONAVLJANO DOZIRANJE TIJEKOM 28 DANA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Kod procjene i vrednovanja toksičkih učinaka tvari važno je uzeti u obzir potencijal određenih klasa tvari da uzrokuju posebne tipove neurotoksičnosti koje možda nije moguće otkriti u drugim studijama toksičnosti. Za neke organofosforne tvari opaženo je da uzrokuju odgođenu neurotoksičnost pa bi trebale postati predmetom vrednovanja.

Za utvrđivanje tvari koje mogu uzrokovati odgođenu polineuoropatiju mogu se upotrijebiti testovi probira *in vitro*; međutim, negativni nalazi *in vitro* studija nisu dokaz da ispitivana tvar nije neurotoksična.

Ovim 28-dnevnim ispitivanjem odgođene neurotoksičnosti dobivaju se informacije o mogućim opasnostima po zdravlje koje bi mogle biti izazvane ponavljanim izlaganjem u ograničenom vremenskom razdoblju. Dobivaju se informacije o reakciji na dozu, a može se dobiti i procjena visine kod koje se ne opaža štetni učinak, što može biti korisno za utvrđivanje sigurnosnih kriterija u pogledu izlaganja.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Organofosforne tvari obuhvaćaju organofosforne estere bez naboja, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosfonske ili organofosforamidne kiseline ili srodne fosforotio, fosfonotio ili fosforotioamidne kiseline, ili druge tvari koje mogu uzrokovati odgođenu neurotoksičnost koje se ponekad vide u toj klasi tvari.

Odgođena neurotoksičnost je sindrom koji se povezuje s produženim odgođenim vremenom prve pojave ataksije, distalnih aksonopatija u leđnoj moždini i perifernom živcu, i inhibiciju i starenje esteraze koja je povezana s neuropatskim djelovanjem (neuropathy target esterase — NTE) u neuralnom tkivu.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Dnevne doze ispitivane tvari daju se oralno domaćim kokošima kontinuirano 28 dana Životinje se opažaju najmanje jednom dnevno s obzirom na anomalije u ponašanju, ataksiju i paralizu tijekom 14 dana nakon posljednje doze. Biokemijska mjerenja, posebno inhibicija esteraze koja je povezana s neuropatskim djelovanjem (NTE), provode se na kokošima koje su nasumice odabrane iz svake skupine, obično 24 i 48 sati nakon posljednje doze. Dva tjedna nakon posljednje doze, preostali broj kokoši se usmrti i provede se histopatološka pretraga odabranog neuralnog tkiva.

▼B

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Pripreme**

Zdrave mlade odrasle kokoši bez virusnih oboljenja koja bi mogla utjecati na istraživanje, koje ne primaju nikakve lijekove i ne pokazuju nepravilnosti u hodu treba nasumice odabrati i svrstati u tretirane i kontrolne skupine, te prilagođavati laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana prije početka istraživanja.

Treba koristiti kaveze ili ograđeni prostor dovoljne veličine da se kokošima omogući slobodno kretanje te treba koristiti lako opažanje hoda.

Svakodnevno oralno doziranje ispitivane tvari, sedam dana u tjednu, poželjno je provoditi sondom ili primjenom želatinskih kapsula. Tekućine se mogu davati nerazrijeđene ili otopljene u odgovarajućem otapalu kao što je kukuruzno ulje; ako je moguće, krute tvari treba otopiti jer apsorpcija velikih doza krute tvari u želatinskim kapsulama može biti nedovoljno učinkovita. Za sva otapala osim vode, toksičke karakteristike moraju biti poznate, a ako nisu, treba ih utvrditi prije ispitivanja.

1.4.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.4.2.1. *Ispitne životinje*

Preporuča se koristiti mlade odrasle domaće nesilice (*Gallus gallus domesticus*), stare do 12 mjeseci. Treba koristiti pasmine i sojeve standardne veličine i kokoši koje su odrasle u uvjetima koji su im omogućivali slobodno kretanje.

1.4.2.2. *Broj i spol*

Obično se koriste tri tretirane skupine i kontrolna skupina za nosač. Kontrolnu skupinu za nosač treba tretirati na identičan način kao i tretiranu skupinu, osim što se ispitivana tvar ne daje.

U svakoj skupini treba biti dovoljan broj kokoši kako bi ih se najmanje šest moglo usmrtiti za biokemijsku analizu (tri u svakoj od dvije vremenske točke), a šest može preživjeti 14-dnevno razdoblje opažanja patologije nakon tretiranja.

1.4.2.3. *Visine doza*

Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir rezultate iz testa odgođene neurotoksičnosti nakon akutnog izlaganja i drugih postojećih podataka o toksičnosti ili kinetici ispitivanog spoja. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem da se izazove toksičko djelovanje, poželjno odgođena neurotoksičnost, ali ne i smrt ili očita patnja. Nakon toga treba odabirati sve niže doze kako bi se dobile sve reakcije vezane uz dozu, i na kraju najniža doza kod koje nema opaženih štetnih učinaka.

▼B

1.4.2.4. *Granični test*

Ako test pri visini doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan, uz primjenu postupaka opisanih za ovu studiju, ne proizvede vidljive toksičke učinke i ako se na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima toksičnost ne očekuje, studija uz primjenu više visine doze može se smatrati nepotrebnom. Granični je test relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom više doze.

1.4.2.5. *Razdoblje opažanja*

Sve životinje treba opažati najmanje jednom dnevno tijekom razdoblja izlaganja i 14 dana nakon toga, osim u slučajevima planirane nekropsije.

1.4.3. **Postupak**

Životinjama se ispitivana tvar daje svakodnevno tijekom 28 dana.

Opća opažanja

Opažanja trebaju početi odmah nakon početka tretiranja. Sve kokoši treba pomno opažati najmanje jednom dnevno svakog dana 28-dnevnog tretiranja i 14 dana nakon doziranja ili do planiranog usmrćenja. Treba bilježiti sve znakove toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, vrstu, ozbiljnost i trajanje anomalija u ponašanju. Opažanjima treba obuhvatiti anomalije u ponašanju, ali se ne smiju ograničiti na njih. Ataksiju treba mjeriti na uobičajenoj ljestvici koja obuhvaća četiri razine, a paralizu treba zabilježiti. Najmanje dvaput tjedno kokoši treba izvaditi iz kaveza i određeno vrijeme podvrgnuti prisilnoj motornoj aktivnosti, kao što je penjanje po ljestvama, čime će se olakšati opažanje minimalnih toksičnih učinaka. Životinje na umoru, u stanju teške patnje ili bola treba ukloniti čim su uočene, humano usmrtiti i izvršiti nekropsiju.

Tjelesna masa

Sve kokoši treba vagati neposredno pred prvu primjenu ispitivane tvari i najmanje jednom tjedno nakon toga.

Biokemijska analiza

Šest nasumice izabranih kokoši iz svake tretirane skupine i kontrolne skupine za nosač treba usmrtiti nekoliko dana nakon posljednje doze, a mozak i lumbarnu leđnu moždinu preparirati i analizirati s obzirom na aktivnost inhibicije esteraze povezane s neuropatskim djelovanjem (NTE). Povrh toga, može biti korisno preparirati i analizirati tkivo bedrenog živca s obzirom na aktivnost inhibicije esteraze povezane s neuropatskim djelovanjem (NTE). Obično se po tri kokoši iz kontrolne i svake tretirane skupine usmrti nakon 24 sata, a po tri 48 sati nakon posljednje doze. Ako rezultati studije akutnog djelovanja ili drugih studija (npr. toksikokinetičkih) ukazuju da je poželjno odrediti drugačije rokove usmrćivanja nakon posljednjeg doziranja, tada te rokove treba primijeniti i dokumentirati razloge.

Na tih uzorcima, ako se smatraju prikladnim, mogu se provoditi i analize acetilkolinesteraze (AChE). Međutim, spontana reaktivacija AChE može se dogoditi *in vivo*, zbog čega se potencijal tvari da djeluje kao inhibitor esteraze AchE može podcijeniti.

▼B

Makroskopska nekropsija

Makroskopska nekropsija svih životinja (planirano usmrćenih i usmrćenih zato što su bile na umoru) treba obuhvatiti opažanje izgleda mozga i leđne moždine.

Histopatološki pregled

Živčano tkivo životinja koje su preživjele razdoblje opažanja i nisu upotrijebljene za biokemijske analize treba mikroskopski pregledati. Tkiva treba fiksirati *in situ*, tehnikama perfuzije. Sekcijom treba obuhvatiti *cerebellum* (mali mozak) (srednju uzdužnu razinu), *medullu oblongatu* (produljenu moždinu), leđnu moždinu i periferne živce. Sekcije leđne moždine uzimaju se iz gornjeg cervikalnog segmenta, regije srednjeg toraksa i lumbo-sakralne regije. Treba uzeti sekcije distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana prema gastrocnemiusu, i sekcije bedrenog živca. Sekcije treba obojiti odgovarajućim bojama za mijelin i aksone. U početku, mikroskopski pregled treba provoditi na konzerviranom tkivu svih životinja u kontrolnoj skupini i skupini koja je tretirana velikom dozom. Ako se učinci utvrde u skupini koja je primala velike doze, mikroskopsku pretragu treba provesti i na kokošima iz skupina koje su primale srednju i malu dozu.

2. **PODACI**

Negativni rezultati analiza odabranih u ovoj metodi (biokemijske pretrage, histopatološke pretrage i opažanje ponašanja) u pravilu znače da dodatno ispitivanje odgođene toksičnosti nije potrebno nastaviti. Kod dvosmislenih rezultata ili rezultata iz kojih nije moguće proizvesti zaključke može biti potrebno dodatno vrednovanje.

Treba osigurati pojedinačne podatke. Dodatno, sve podatke treba sažeti u tablici u kojoj treba navesti broj životinja u svakoj skupini na početku ispitivanja, broj životinja s lezijama, učincima na ponašanje ili biokemijskim učincima, tipove i ozbiljnost tih lezija ili učinaka, i postotak životinja po vrsti i ozbiljnosti lezije ili učinka.

Nalaze ove studije treba vrednovati s obzirom na učestalost, ozbiljnost i korelaciju učinaka na ponašanje, te biokemijskih i histopatoloških učinaka i eventualnih drugih opaženih učinaka kod tretiranih ili kontrolnih skupina.

Numeričke rezultate treba vrednovati odgovarajućim opće prihvatljivim statističkim metodama. Odabir statističke metode koja će se koristiti obavlja se u okviru planiranja studije.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju treba, ako je moguće, sadržavati slijedeće informacije:

3.1. Ispitne životinje:

— soj koji je upotrijebljen,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja itd.,

— pojedinačne mase životinja na početku ispitivanja.

▼B

3.2. Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o pripremi ispitivane tvari, njezinoj stabilnosti i homogenosti, prema potrebi,

— opravdanost izbora nosača,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— podloge za odabir visine doze,

— specifikacija primijenjenih doza, s uključenim podacima o nosaču, volumenu i fizičkom obliku u kojem je materijal primijenjen,

— podloge za izbor drugih rokova za biokemijsku analizu, ako nisu 24 i 48 sati.

3.3. Rezultati:

— podaci o tjelesnoj masi,

— podaci o toksičkoj reakciji po visini doze, uključujući smrtnost,

— visina doze kod koje se ne uočava štetni učinak,

— karakter, ozbiljnost i trajanje kliničkih opažanja (jesu li reverzibilna ili ne),

— iscrpan opis metoda i nalaza biokemijske analize,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis svih histopatoloških nalaza,

— prema potrebi, statistička obrada rezultata.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

Ova je metoda analogna Smjernici za ispitivanje OECD–a TG 419.

▼B

B.39. TEST NEPLANIRANE SINTEZE DNK (UDS) NA STANICAMA JETRE SISAVACA IN VIVO

1. METODA

Ova je metoda replika Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 486, Test neplanirane sinteze DNK (UDS) na stanicama jetre sisavaca *in vivo* (1997.)

1.1. UVOD

Test neplanirane sinteze DNK (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) na stanicama jetre sisavaca *in vivo* provodi se kako bi se utvrdilo koje ispitivane tvari u stanicama jetre tretiranih životinja induciraju popravak DNK (vidjeti 1., 2., 3., 4.).

Ovaj *in vivo* test predstavlja metodu za istraživanje genotoksičkih učinaka kemikalija u jetri. Izmjereni učinak pokazatelj je oštećenja i naknadnog popravka DNK u stanicama jetre. Jetra je obično glavno mjesto metabolizma apsorbiranih spojeva. Stoga je prikladna za mjerenje oštećenja DNK *in vivo*.

Ovaj test nije primjeren ako je očito da ispitivana tvar neće stići do ciljnog tkiva.

Neplanirana sinteza DNK (UDS) mjeri se određivanjem ugradnje obilježenih nukleozida u stanice u kojima se ne odvija planirana sinteza DNK (S-faza). Najčešće primjenjivana tehnika je određivanje ugradnje timidina obilježenog tritijem (^{3}H-TdR) autoradiografijom. Za ispitivanja neplanirane sinteze DNK *in vivo* poželjno je koristiti jetru štakora. Mogu se koristiti i druga tkiva osim jetre, ali ona nisu predmet ove metode.

Otkrivanje neplanirane sinteze DNK (UDS) ovisi o broju baza DNK odstranjenih ekscizijom i zamijenjenih na mjestu oštećenja. Stoga je test neplanirane sinteze DNK (UDS) posebno koristan za otkrivanje popravaka dugih sekvenci (20-30 baza). Suprotno tomu, popravak kratkih sekvenci (1-3 baze) otkriva se uz znatno nižu osjetljivost. Nadalje, uslijed izostanka popravka, pogrešnog popravka ili pogrešnog repliciranja DNK lezija može doći do mutagenih događanja. Jačina neplanirane sinteze DNK (UDS) nije pokazatelj da je postupak popravka vjeran. Nadalje, moguće je da mutagen reagira s DNK, ali da se oštećenje DNK ne popravi postupkom ekscizije. Izostanak posebnih informacija o aktivnosti mutagena u testu neplanirane sinteze DNK (UDS) nadoknađuje se potencijalnom osjetljivošću tog kriterija jer se isti mjeri u cijelom genomu.

Vidjeti također Opći uvod, dio B.

1.2. DEFINICIJE

Stanice u tijeku popravka: neto broj zrnaca u jezgri (NNG) veći od unaprijed postavljene vrijednosti, razlog čega treba utvrditi u laboratoriju koji provodi test.

Neto broj zrnaca u jezgri (NNG): količinski izmjerena aktivnost neplanirane sinteze DNK stanica u autoradiografskom UDS testu, koja se izračunava oduzimanjem prosječnog broja zrnaca na površinama citoplazme koje su ekvivalentne jezgri (CG) od broja zrnaca u jezgri (NG): NNG = NG – CG. Iznosi NNG izračunavaju se za pojedinačne stanice i zatim objedinjuju za stanice u kulturi, paralelnim kulturama itd.

▼B

Neplanirana sinteza DNK (UDS): sinteza za popravak DNK nakon ekscizije i odstranjenja onog niza DNK koji obuhvaća područje oštećenja koje je izazvano kemijskim tvarima ili fizičkim agensom.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivanje neplanirane sinteze DNK (UDS) u stanicama jetre sisavaca *in vivo* pokazatelj je sinteze za popravak DNK nakon ekscizije i odstranjenja niza DNK koji sadrži područje oštećenja izazvanog kemijskim tvarima ili fizičkim agensom. Pokus se obično temelji na ugradnji ^{3}H-TdR u DNK stanica jetre koje imaju nisku frekvenciju stanica u S fazi staničnog ciklusa. Ugradnja ^{3}H-TdR obično se određuje autoradijografijom, jer ta tehnika nije toliko osjetljiva na interferenciju uslijed stanica S-faze kao, primjerice, scintilacijski brojači.

1.4. OPIS METODE

1.4.1. **Pripreme**

1.4.1.1. *Odabir životinjskih vrsta*

Obično se koriste štakori, iako se može koristiti bilo koja prikladna vrsta sisavaca. Treba koristiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji se obično koriste u laboratorijskim istraživanjima. Na početku studije odstupanje mase životinja treba biti minimalno i ne smije prelaziti ± 20 % srednje mase za svaki spol.

1.4.1.2. *Uvjeti smještaja i prehrane*

Primjenjuju se opći uvjeti navedeni u Općem uvodu, dio B, iako bi ciljna vrijednost vlage trebala biti 50-60 %.

1.4.1.3. *Priprema životinja*

Zdrave mlade odrasle životinje biraju se nasumice i raspodjeljuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Kaveze treba urediti na način da se eventualni učinci držanja u kavezu svedu na minimum. Životinje se jednoznačno identificiraju i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka studije kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

1.4.1.4. *Ispitivana tvar/Pripravak*

Prije no što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima i razrijediti. Tekuće ispitivane tvari mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo, pripravke ispitivane tvari treba koristiti svježe.

1.4.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.4.2.1. *Otapalo/Nosač*

Pri visinama doza koje se koriste, otapalo/nosač ne smije imati toksičke učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanim tvarima. Ako se primjenjuju manje poznata otapala/nosači, njihovo bi uključivanje u ispitivanje trebalo biti potkrijepljeno podacima koji dokazuju njihovu pogodnost. Kad god je to moguće preporuča se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača.

▼B

1.4.2.2. *Kontrole*

U svaki dio pokusa koji se provodi neovisno, treba uključiti paralelne pozitivne i negativne kontrole (otapalo/nosač). Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u tretiranim skupinama.

Pozitivne kontrole su tvari za koje je poznato da izazivaju neplaniranu sintezu DNK (UDS) ako se primjenjuju na razinama izlaganja kod kojih se očekuje uočljivo povećanje u odnosu na podlogu. Pozitivne kontrole za koje je potrebna metabolička aktivacija treba koristiti u dozama koje izazivaju umjerenu reakciju (4). Doze se mogu birati na način da učinci budu jasni, ali da osoba koja očitava rezultate ipak ne može odmah vidjeti identitet kodiranih mikroskopskih preparata. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu obuhvaćaju:

Vrijeme uzorkovanja	Tvar	CAS br.	EINECS br.
Rano uzorkovanje (2-4 sata)	N-Nitrosodimetilamin	62-75-9	200-249-8
Kasno uzorkovanje (12-16 sati)	N-2-Fluorenilacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Za pozitivnu kontrolu mogu se koristiti i druge tvari. Prihvatljivo je tvari za pozitivnu kontrolu primijeniti putem koji se razlikuje od puta primjene ispitivane tvari.

1.5. POSTUPAK

1.5.1. **Broj i spol životinja**

Treba koristiti odgovarajući broj životinja kako bi se mogle uzeti u obzir prirodne biološke razlike u pojedinoj ispitivanoj reakciji. Broj životinja treba odrediti na način da po skupini bude najmanje tri životinje pogodne za analizu. Ako iz ranijih studija postoji značajna baza podataka, u paralelnim negativnim i pozitivnim kontrolnim skupinama dovoljno je imati samo jednu ili dvije životinje.

Ako su u vrijeme provođenja studije dostupni podaci iz studija provedenih na istoj životinjskoj vrsti uz primjenu istog puta izlaganja, koji dokazuju da nema znatnih razlika u toksičnosti s obzirom na spol, ispitivanje na jednom spolu, po mogućnosti mužjacima, bit će dovoljno. U slučajevima kad izloženost ljudi nekoj kemikaliji može biti vezana uz spol, kao što je slučaj s nekim farmaceutskim sredstvima, test treba obaviti na životinjama odgovarajućeg spola.

1.5.2. **Plan tretiranja**

Ispitivane tvari obično se primjenjuju jednokratno.

1.5.3. **Visine doze**

Obično se koriste barem dvije visine doze. Najviša se doza definira kao doza koja uzrokuje takve znakove toksičnosti da je za očekivati da bi više doze pri istom režimu doziranja prouzročile smrt. Općenito, niža doza treba iznositi 50 % do 25 % visoke doze.

▼B

Tvari koje u niskim netoksičnim dozama imaju specifično biološko djelovanje (poput hormona i mitogena) mogu biti izuzete od kriterija za utvrđivanje doza te ih se treba ocjenjivati od slučaju do slučaja. Ako se u nedostatku odgovarajućih podataka provodi studija za utvrđivanje raspona, studiju treba provesti isti laboratorij, na istoj vrsti, soju, spolu i s istim režimom tretiranja kao i u glavnoj studiji.

Najviša se doza isto tako može definirati kao doza koja uzrokuje pojavu nekih pokazatelja toksičnosti u jetri (npr. piknotiza jezgre).

1.5.4. **Granični test**

Ako test pri jednoj visini doze od najmanje 2 000 mg/kg tjelesne mase, primijenjenoj jednokratno ili u dva tretiranja istog dana, ne proizvede vidljive toksičke učinke i ako se na temelju podataka o strukturno srodnim tvarima genotoksičnost ne očekuje, potpuna studija možda nije potrebna. Očekivana izloženost ljudi može ukazati na potrebu da se u graničnom testu primijeni viša doza.

1.5.5. **Primjena doza**

Ispitivana se tvar obično primjenjuje unošenjem pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Drugi putevi primjene mogu biti prihvatljivi ako se za njih može dokazati da su opravdani. Međutim, intraperiotonealni put primjene ne preporuča se jer bi na taj način jetra bila izložena ispitivanoj tvari izravno, a ne preko sustava cirkulacije. Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti putem sonde ili injekcije ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne bi smio biti veći od 2 ml/100 g tjelesne mase. Opravdanost primjene većih volumena od navedenog treba dokazati. Osim kod nadražujućih i nagrizajućih tvari, koje pri višim koncentracijama obično izazivaju negativne učinke, variranje ispitnih volumena treba podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod svih koncentracija osigurao stalni volumen.

1.5.6. **Pripravci stanica jetre**

Stanice jetre tretiranih životinja prepariraju se 12-16 sati nakon doziranja. Dodatno ranije uzorkovanje (najčešće dva do četiri sata nakon tretiranja) obično je potrebno ako u tom roku 12-16 sati izostane jasna pozitivna reakcija. Međutim, moguće je primijeniti i alternativne rokove uzorkovanja ako je to opravdano na temelju toksikokinetičkih podataka.

Kratkotrajne kulture stanica jetre sisavaca obično se dobivaju perfuzijom jetre *in situ* kolagenazom nakon čega se pusti da se svježe odvojene stanice jetre priljube uz prikladnu površinu. Stanice jetre životinja iz negativne kontrolne skupine životinja trebaju imati preživljavanje (5) od najmanje 50 %.

1.5.7. **Određivanje neplanirane sinteze DNK (UDS)**

Svježe izolirane stanice jetre sisavaca obično se dovoljno dugo, npr. 3-8 sati, inkubiraju medijem koji sadrži ^{3}H-TdR. Na kraju razdoblja inkubacije, medij treba odstraniti iz stanica koje zatim treba inkubirati medijem koji sadrži prekomjernu količinu neobilježenog timidina kako bi se umanjila radioaktivnost preostala nakon ugradnje („cold chase”). Stanice se zatim isperu, fiksiraju i osuše. Za produžena vremena inkubacije postupak „cold chase” možda neće biti potreban. Preparati se umoče u emulziju za autoradiografiju i ostave izloženi u mraku (npr. hlađeni tijekom 7-14 dana), razviju se, boje, te se zatim prebrojavaju izložena srebrna zrnca. Za svaku životinju pripreme se dva do tri preparata.

▼B

1.5.8. **Analiza**

Pripremljeni preparati moraju sadržavati dovoljan broj stanica normalne morfologije kako bi se omogućila smislena procjene neplanirane sinteze DNK (UDS). Preparati se pregledavaju mikroskopski kako bi se utvrdili znakovi otvorene citotoksičnosti (npr. piknoza, smanjene razine obilježavanja radioaktivnim izotopom).

Prije brojanja zrnca preparate treba kodirati. Obično se analizira 100 stanica svake životinje na temelju najmanje dva preparata; ako se analizira manje od 100 stanica/životinji, za to treba navesti opravdani razlog. Broj zrnaca ne analizira se za jezgru S-faze, ali omjer stanica S-faze može se zabilježiti.

Količinu ^{3}H-TdR ugrađenu u jezgru i citoplazmu morfološki normalnih stanica, koja se uočava deponiranim srebrnim zrncima, treba utvrditi prikladnim metodama.

Broj zrnaca određuje se u jezgri (zrnca jezgre, NG) i na površinama citoplazme koje su ekvivalentne jezgri (zrnca citoplazme, CG). Broj zrnaca CG određuje se bilo na temelju najjače obilježene površine citoplazme, ili iz prosjeka od dva do tri broja zrnaca citoplazme iz nasumice odabranih površina u blizini jezgre. Mogu se primijeniti i druge metode brojanja (npr. brojanje cijele stanice), ako se njihova opravdanost može dokazati (6).

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Treba osigurati preparate i podatke za svaku životinju pojedinačno. Dodatno, podatke treba sažeti u tabličnom obliku. Neto broj zrnaca jezgre (NNG) izračunava se za svaku stanicu, svaku životinju i za svaku dozu i vrijeme oduzimanjem broja CG od broja NG. Ako se broje „stanice u tijeku popravka”, opravdanost kriterija za njihovo definiranje treba dokazati i temeljiti na ranije poznatim podacima ili podacima iz paralelne negativne kontrolne skupine. Ako se primjenjuju, statističke testove treba odabrati i njihovu opravdanost dokazati prije provođenja studije.

2.2. VREDNOVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

Primjeri kriterija na temelju kojih se može donijeti zaključak o pozitivnoj/negativnoj reakciji uključuju:

pozitivna
- i. vrijednosti NNG iznad unaprijed postavljenog praga čija je opravdanost dokazana na temelju povijesnih laboratorijskih podataka; ili
- ii. vrijednosti NNG znatno veće od paralelne kontrole;

negativna
- i. vrijednosti NNG unutar/ispod povijesnog praga kontrole; ili
- ii. vrijednosti NNG koje nisu znatno veće od paralelne kontrole.

▼B

Treba razmotriti biološku relevantnost podataka: tj. uzeti u obzir parametre kao što su varijacije između pojedinih životinja, odnos doza-reakcija i citotoksičnost. Kao pomoć u vrednovanju rezultata testa mogu se koristiti statističke metode. Međutim, statistički značaj ne bi smio biti jedini čimbenik na temelju kojeg se zaključuje da je reakcija pozitivna.

Iako će većina pokusa dati jasne pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima set prikupljenih podataka neće omogućiti donošenje kategoričkog zaključka o aktivnosti ispitivane tvari. Bez obzir na broj ponavljanja pokusa, rezultati mogu ostati dvosmisleni ili upitni.

Pozitivan rezultat testa neplanirane sinteze DNK (UDS) na stanicama jetre sisavaca *in vivo* pokazuje da ispitivana tvar inducira oštećenje DNK u stanicama jetre sisavaca *in vivo* koje se može popraviti neplaniranom sintezom DNK *in vitro*. Negativan rezultat pokazuje da, u ispitnim uvjetima, ispitivana tvar ne inducira oštećenje DNK koje se može otkriti ovim pokusom.

Vjerojatnost da je ispitivana tvar stigla do glavnog krvotoka ili konkretno do ciljnog tkiva (npr. sustavna toksičnost) treba raspraviti.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora, sadržavati slijedeće informacije:

Otapalo/nosač:

— opravdanost odabira nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane tvari u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Ispitne životinje:

— upotrijebljena vrsta/soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon tjelesnih masa, srednje i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Uvjeti ispitivanja:

— pozitivna i negativna kontrola za nosač/otapalo,

— podaci iz studije za utvrđivanje raspona, ako je provedena,

— podloge za odabir visine doze,

— pojedinosti o pripravcima ispitivane tvari,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari,

— podloge za odabir puta primjene,

— metode za verifikaciju da je ispitivani agens stigao do glavnog krvotoka ili ciljnog tkiva, ako je primjenljivo,

▼B

— način preračunavanja koncentracije ispitivane tvari u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne mase/dan), ako je primjenljivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— detaljan opis plana tretiranja i uzorkovanja,

— metode mjerenja toksičnosti,

— metoda za izradu pripravaka i kulture stanica jetre,

— upotrijebljena tehnika autoradiografije,

— broj pripravljenih preparata i broj analiziranih stanica,

— kriteriji za vrednovanje,

— kriteriji prema kojima se studija smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom.

Rezultati:

— srednje vrijednosti broja zrnaca u jezgri, zrnaca u citoplazmi i neto broja zrnaca u jezgri po pojedinačnom preparatu, životinji i skupini,

— odnos doza-reakcija, ako je dostupan,

— statistička procjena, ako postoji,

— znakovi toksičnosti,

— podaci o paralelnoj negativnoj kontroli (otapalo/nosač) i pozitivnoj kontroli,

— povijesni podaci o negativnim (otapalo/nosač) i pozitivnim kontrolama s rasponima, prosječnim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— broj „stanica u tijeku popravka”, ako je utvrđen

— broj stanica S-faze, ako je utvrđen,

— preživljavanje stanica.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G., (1985) An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, str. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G., (1987) A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, str. 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G., (1993) *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H., (1993) Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, str. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C., (1993) Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, str. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E., (1982) Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, str. 553-562.

▼M8

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 430 (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]) Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40. pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om (1.) i CLP-om.

2. Procjena nagrizajućeg djelovanja na kožu obično je obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40., validirane su i donesene druge ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože, kao što su ispitna metoda B.40.*bis* (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.), kojima se mogu utvrditi i potkategorije korozivnih kemikalija ako je potrebno. Doneseno je nekoliko validiranih ispitnih metoda *in vitro*, kao što je ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (5.), koje treba upotrebljavati za ispitivanje nadraženosti kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju različiti izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).

3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrizanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na ispitnoj metodi transkutanog električnog otpora (TER) na koži štakora kod koje se upotrebljavaju diskovi kože kako bi se identificirale nagrizajuće tvari prema njihovoj sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i.

4. Kako bi se u regulatorne svrhe ocijenilo *in vitro* ispitivanje nagrizanja kože provedene su predvalidacijske studije (7.) nakon čega je slijedila službena validacijska studija ispitne metode TER-a na koži štakora za procjenu nagrizanja kože (8., 9., 10. i 11.). Rezultati tih studija doveli su do preporuke da

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

▼M8

bi se ispitna metoda TER-a (imenovana validiranom referentnom metodom) mogla upotrebljavati u regulatorne svrhe za procjenu *in vivo* nagrizajućeg djelovanja na kožu (12., 13. i 14.).

5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda TER-a *in vitro* za nagrizanje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njezinu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njezinu predloženu uporabu kako bi se osigurala njezina sličnost s validiranom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvedbe (15.). OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

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

8. Ova se ispitna metoda bavi nagrizanjem kože *in vitro*. Omogućuje identifikaciju ispitivanih kemikalija koje ne djeluju nagrizajuće i onih koje djeluju nagrizajuće u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Ograničenje ove ispitne metode, kako je pokazano validacijskim studijama (8., 9., 10. i 11.), jest to što ne omogućuje daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Primjenjivim regulatornim okvirom utvrdit će se način upotrebe ove ispitne metode. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi učinkom koji nadraživanje kože *in vitro* ima na zdravlje (5.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o IATA-i (6.).

9. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija koje uglavnom čine tvari, a empirijskom bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno 60 tvari koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8. i 9.). Na temelju svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Međutim, budući da za posebna agregatna stanja nisu lako raspoložive ispitivane stavke s odgovarajućim referentnim podacima, trebalo bi napomenuti da je tijekom validacije procijenjen relativno malen broj voskova i nagrizajućih krutih tvari. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije tvari, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju tvari. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012.) (18.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se

▼M8

njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8. i 9.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom ispitne metode TER-a, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u trajanju do 24 sata na epidermalne površine diskova kože u dvodijelnom ispitnom sustavu u kojem diskovi kože djeluju kao pregrada između dva odjeljka. Diskovi kože uzeti su od humano usmrćenih štakora u dobi od 28 do 30 dana. Nagrizajuće kemikalije identificirane su prema sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*, što se mjeri kao smanjenje TER vrijednosti ispod razine praga (16.) (vidjeti stavak 32.). Za TER vrijednosti za kožu štakora, vrijednost praga u iznosu od 5 kΩ odabrana je na temelju mnogobrojnih podataka za širok raspon tvari kod kojih je velika većina vrijednosti jasno bila ili znatno iznad (često > 10 kΩ), ili znatno ispod (često < 3 kΩ) te vrijednosti (16.). Općenito, ispitivane kemikalije koje na životinje ne djeluju nagrizajuće, već su nadražujuće ili nenadražujuće, ne smanjuju TER ispod te vrijednosti praga. Nadalje, uporaba drugih preparata kože ili druge opreme može modificirati vrijednost praga, što znači da je potrebna dodatna validacija.

11. U ispitni postupak ugrađena je i faza vezanja boje kojom se potvrđuju pozitivni rezultati za TER u vrijednostima od približno 5 kΩ. Postupkom vezanja boje određuje se može li se povećanje ionske permeabilnosti pripisati fizičkom uništenju *stratum corneum*. Pokazalo se da se TER metodom uz primjenu kože štakora može predvidjeti nagrizajuće djelovanje *in vivo* kod kunića koji su procjenjivani ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

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

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti ([1])

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ([2])	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju *in vivo* rezultata ([3])	Kat. VRM-a na temelju *in vitro* rezultata	Agregatno stanje	pH ([4])
Tvari koje djeluju nagrizajuće *in vivo*						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1.A	6 × C	Tekuće	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1.A	6 × C	Tekuće	8,3

▼**M8**

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

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

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

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

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

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

▼M8

POSTUPAK

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

Životinje

14. Trebali bi se upotrebljavati štakori jer je osjetljivost njihove kože na tvari u ovoj ispitnoj metodi prethodno dokazana (12.) te je jedini izvor kože koji je službeno validiran (8. i 9.). Dob (u kojoj se koža prikuplja) i soj štakora posebno su važni kako bi se osiguralo da folikuli dlake budu u latentnoj fazi prije početka rasta odraslih dlaka.

15. Dlaka na leđima i bokovima mladih, približno 22 dana starih mužjaka ili ženki štakora (soja Wistar ili nekog usporedivog soja) pažljivo se ukloni malim škarama. Životinje se zatim operu nježnim brisanjem, a ošišana se površina umoči u antibiotsku otopinu (koja sadržava, primjerice, streptomicin, penicilin, kloramfenikol i amfotericin u koncentracijama koje su učinkovite u inhibiciji rasta bakterija). Životinje se ponovno operu antibioticima trećeg ili četvrtog dana nakon prvog pranja i koriste u roku od tri dana nakon drugog pranja, kad se *stratum corneum* oporavi od odstranjivanja dlake.

Priprema diskova kože

16. Životinje se humano usmrte kad su stare 28–30 dana; ta je dob veoma važna. Sa svake životinje odstrani se bočna koža na leđima s koje se opreznim ljuštenjem oguli prekomjerna potkožna mast. Odstrane se diskovi kože, u promjeru svaki približno 20 mm. Prije uporabe diskova koža se može skladištiti ako se pokaže da su podaci za pozitivnu i negativnu kontrolu istovjetni podacima dobivenima sa svježom kožom.

17. Po jedan disk stavi se preko jednog kraja teflonske (politetrafluoretilenske) cijevi, osiguravajući da je epidermalna površina u dodiru s cijevi. Gumeni O-prsten pritisne se preko ruba cijevi kako bi se učvrstila koža, a višak tkiva se odreže. Gumeni O-prsten zatim se dužinom ruba teflonske cijevi oprezno zabrtvi petrolejskim gelom. Cijev se uvede u prihvatnu komoru koja sadržava otopinu $MgSO_4$ (154 mM) u kojoj je pridržava opružna štipaljka (slika 1.). Disk kože treba potpuno potopiti u otopinu $MgSO_4$. Od kože jednog štakora može se dobiti čak 10–15 diskova kože. Dimenzije cijevi i O-prstena prikazane su na slici 2.

18. Prije početka ispitivanja mjeri se TER na dva kožna diska kao postupak kojim se kontrolira kvaliteta kože svake životinje. Kako bi se preostali diskovi te kože mogli koristiti u ispitnoj metodi, oba kontrolna diska moraju dati vrijednosti električnog otpora veće od 10 kΩ. Ako je vrijednost otpora manja od 10 kΩ, preostale diskove te kože treba baciti.

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

19. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti istodobne pozitivne i negativne kontrole kako bi se osigurala odgovarajuća uspješnost pokusnog modela. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti diskove kože jedne životinje. Kao ispitivane kemikalije pozitivne i negativne kontrole predlažu se 10 M klorovodična kiselina odnosno destilirana voda.

▼M8

20. Tekuće ispitivane kemikalije (150 µl) primjenjuju se ravnomjerno na epidermalnu površinu unutar cijevi. Kod ispitivanja krutih materijala, dovoljna količina krute tvari primjenjuje se ravnomjerno na disk kako bi se osigurala pokrivenost cijele epiderme. Na krutu tvar dodaje se deionizirana voda (150 µl) i cijev se pažljivo protrese. Za postizanje maksimalnog dodira s kožom, krute tvari možda treba zagrijati na 30 °C kako bi se ispitivana tvar rastopila ili omekšala ili samljeti kako bi se dobio zrnati materijal ili prah.

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

Mjerenja transkutanog električnog otpora (TER)

22. Impedancija kože mjeri se kao transkutani električni otpor (TER) upotrebom Wheatstoneova mjernog mosta na niskonaponsku izmjeničnu struju (18.). Opće su specifikacije mosta radni napon 1–3 volta, izmjenična struja sinusnog ili pravokutnog oblika 50–1 000 Hz i mjerno područje od najmanje 0,1–30 kΩ. Mjerni most koji je korišten u validacijskoj studiji mjerio je induktivitet, kapacitivnost i otpor do vrijednosti 2 000 H, 2 000 µF odnosno 2 MΩ, kod frekvencija od 100 Hz ili 1 kHz, primjenom serijskih ili paralelnih vrijednosti. U svrhu testa otkrivanja nagrizajućeg djelovanja, mjerenja transkutanog električnog otpora bilježe se pri frekvenciji od 100 Hz primjenom serijskih vrijednosti. Prije mjerenja električnog otpora, površinska napetost kože smanjuje se dodavanjem dovoljnog volumena 70-postotnog etanola koji se nanosi na epidermu. Nakon nekoliko sekundi etanol se uklanja iz cijevi, a tkivo se hidratizira dodavanjem 3 ml otopine $MgSO_4$ (154 mM). Elektrode mjernog mosta postavljaju se na obje strane diska kože kako bi se izmjerio otpor u kΩ/disk kože (slika 1.). Dimenzije elektrode i duljina elektrode izložene ispod krokodilskih štipaljki prikazane su na slici 2. Štipaljka na unutarnjoj elektrodi za vrijeme mjerenja otpora stoji na vrhu teflonske cijevi kako bi se osiguralo da u otopinu $MgSO_4$ bude uronjena stalno ista duljina elektrode. Vanjska elektroda postavlja se unutar komore na način da stoji na dnu komore. Razmak između opružne štipaljke i dna teflonske cijevi održava se nepromjenjivim (slika 2.) jer ta udaljenost utječe na dobivene vrijednosti otpora. Zbog toga, razmak između unutarnje elektrode i diska kože treba biti nepromjenjiv i minimalan (1–2 mm).

23. Ako je izmjerena vrijednost otpora veća od 20 kΩ, to može biti posljedica preostalog sloja ispitivane kemikalije na epidermalnoj površini diska kože. Ponovno treba pokušati ukloniti taj sloj, primjerice, tako da se teflonska cijev zatvori pritiskom prsta zaštićenog rukavicom i protrese približno deset sekundi; otopina $MgSO_4$ baca se i mjerenje otpora ponavlja se s novom otopinom $MgSO_4$.

24. Svojstva i dimenzije ispitnog uređaja i primijenjen ispitni postupak mogu utjecati na dobivene vrijednosti transkutanog električnog otpora. Prag od 5 kΩ za nagrizajuće djelovanje određen je iz podataka dobivenih konkretnim uređajem i postupkom opisanim u ovoj ispitnoj metodi. Ako se ispitni uvjeti izmijene ili se primijeni drukčiji uređaj, mogu vrijediti drugačiji pragovi i kontrolne vrijednosti. Stoga je potrebno kalibrirati metodologiju i vrijednosti praga otpora ispitivanjem niza tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti odabranih među tvarima koje su korištene u validacijskoj studiji (8. i 9.) ili kemikalijama koje su iz kemijski sličnih razreda kao tvari koje se istražuju. Niz odgovarajućih tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti utvrđen je u tablici 1.

▼M8

Metode vezanja boje

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

Primjena i odstranjivanje boje sulforodamina B

26. Nakon procjene vrijednosti TER, magnezijev sulfat evakuira se iz cijevi i koža se pažljivo pregleda s obzirom na vidljiva oštećenja. Ako nema očitih velikih oštećenja (npr. perforacija), 150 µl 10-postotne (w/v) otopine boje sulforodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS broj 3520-42-1) u destiliranoj vodi primjenjuje se na epidermalnu površinu svakog diska kože tijekom dva sata. Zatim se ti diskovi kože približno deset sekundi ispiru vodom iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature kako bi se time uklonio višak boje ili nevezana boja. Svaki disk kože oprezno se skine s teflonske cijevi i stavi u tikvicu (npr. tikvicu od 20 ml za scintilaciju) koja sadržava deioniziranu vodu (8 ml). Tikvice se nježno tresu pet minuta kako bi se odstranila eventualna preostala nevezana boja. Zatim se ponavlja postupak ispiranja, nakon kojega se diskovi kože skidaju i stavljaju u tikvice koje sadržavaju 5 ml 30-postotnog (w/v) natrijevog dodecil-sulfata (SDS) u destiliranoj vodi i ostave se inkubirati preko noći na 60 °C.

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

Izračun sadržaja boje

28. Sadržaj boje sulforodamin B po disku računa se iz vrijednosti optičke gustoće (OD) (9.) (koeficijent molarne ekstinkcije sulforodamina B na 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$; molekulska masa = 580). Sadržaj boje određuje se za svaki disk kože primjenom odgovarajuće kalibracijske krivulje, zatim se za ponovljene pokuse izračunava srednja vrijednost sadržaja boje.

Kriteriji prihvatljivosti

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

▼**M8**

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

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

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

Tumačenje rezultata

31. Granična vrijednost TER-a koja služi za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih kemikalija utvrđena je tijekom optimizacije ispitne metode, ispitana tijekom predvalidacijske faze i potvrđena u službenoj validacijskoj studiji.

32. Model predviđanja za ispitnu metodu TER-a na koži štakora za ispitivanje nagrizanja kože (9. i 19.), povezan sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om naveden je u nastavku.

Ispitivana kemikalija ne smatra se nagrizajućom za kožu:

i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju veća od (>) 5 kΩ; ili

ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ; i

— ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), i

— ako je srednja vrijednost sadržaja boje diska manja od (<) srednje vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).

Ispitivana kemikalija smatra se nagrizajućom za kožu:

i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ i ako su diskovi kože vidljivo oštećeni (npr. perforirani); ili

ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ i:

— ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), ali

▼M8

— srednja vrijednost sadržaja boje diska veća je ili jednaka (≥) srednjoj vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).

33. Ciklus ispitivanja (pokus) koji obuhvaća najmanje tri ponovljena diska kože trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednja vrijednost TER-a od 5 ± 0,5 kΩ, trebalo bi razmotriti drugi neovisni ciklus ispitivanja (pokus), a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa ispitivanja (pokusa).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

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

Izvješće o ispitivanju

35. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

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

— tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

Ispitne životinje:

— soj i spol koji je upotrijebljen,

— dob životinja kad su upotrijebljene kao donorske životinje,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— pojedinosti o preparatu kože.

▼**M8**

Ispitni uvjeti:

— kalibracijske krivulje za ispitni uređaj,

— kalibracijske krivulje za provođenje testa vezanja boje, pojas koji se upotrebljava za mjerenje optičke gustoće (OD) i raspon linearnosti OD-a uređaja za mjerenje (npr. spektrofotometra), ako je primjereno,

— pojedinosti o ispitnom postupku upotrijebljenom za mjerenja TER-a,

— pojedinosti o ispitnom postupku za procjenu vezivanja boje, ako je primjereno,

— upotrijebljene ispitne doze, trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,

— pojedinosti o postupku ispiranja upotrijebljenom nakon razdoblja izlaganja,

— broj ponovljenih diskova kože upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna i negativna kontrola),

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

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

  i) prihvatljivost vrijednosti TER-a pozitivnih i negativnih kontrola (u kΩ) u odnosu na raspone otpora pozitivnih i negativnih kontrola;

  ii) prihvatljivost vrijednosti sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola (u μg/disku) u odnosu na raspone sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola;

  iii) prihvatljivost rezultata ispitivanja u odnosu na prijašnju varijabilnost među ponovljenim diskovima kože,

— opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja.

Rezultati:

— tablični podaci iz testova za utvrđivanje vrijednosti TER-a i vezivanja boje (ako je primjereno) za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svaki ciklus ispitivanja (pokus) i svaki ponovljeni disk kože (pojedinačne životinje i pojedinačni uzorci kože), srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV),

— opis svih uočenih učinaka,

— utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.

3. Poglavlje B.40.*bis* ovog Priloga, Model kože *in vitro*.

4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.

5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.

6. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219.–255.

8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471.–482.

9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483.–524.

10. Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129.–147.

11. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.

12. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.

13. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275.–280.

14. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.

15. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

16. Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507.–512.

17. Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191.–194.

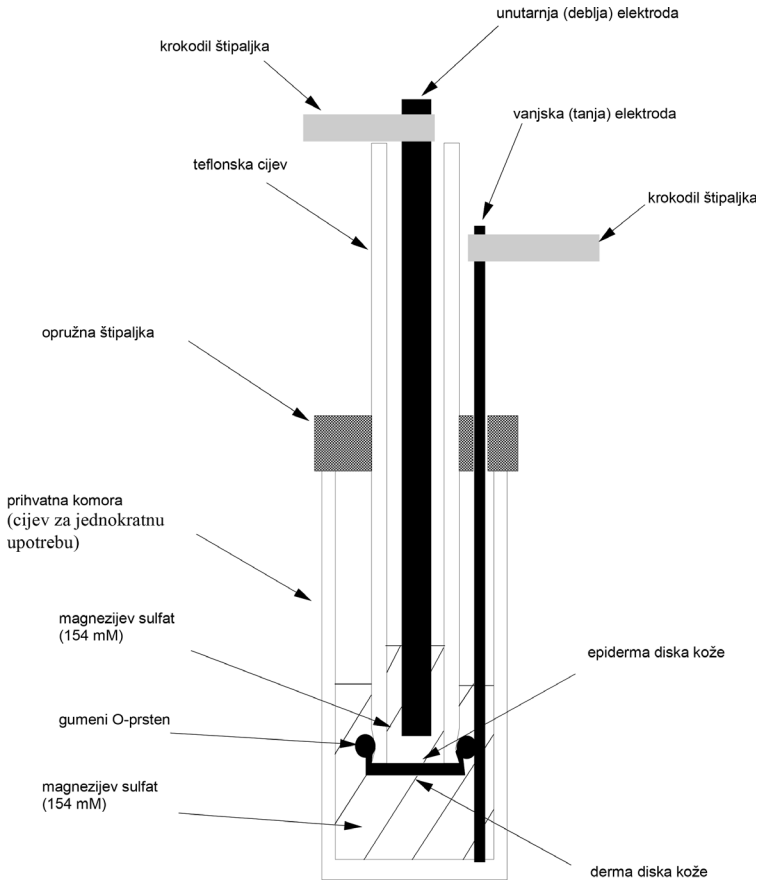
18. Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol. Pharmacol.* 62, 393.–403.

19. TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

20. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Slika 1.

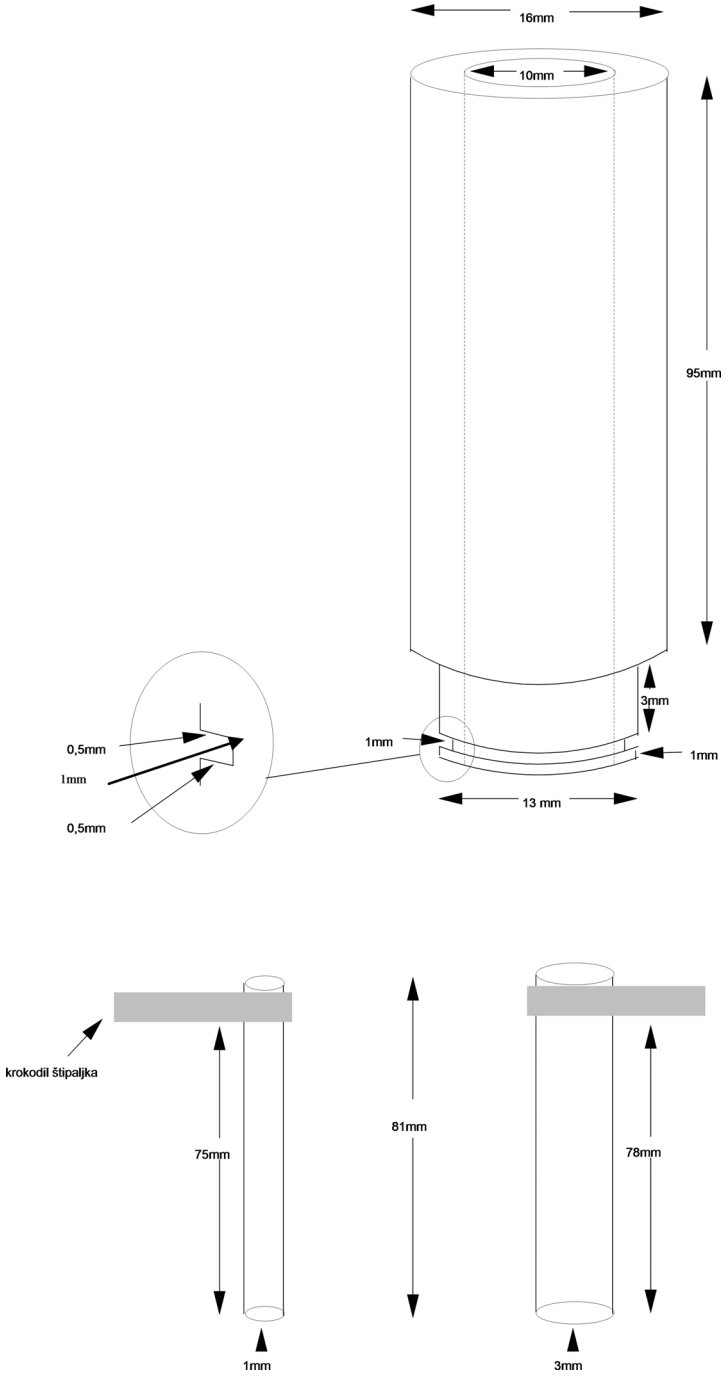
Ređaj za Test Transkutanog Električnog Otpora (TER) na Koži Štakora



▼**M8**

Slika 2.

Dimenzije Upotrijebljene Teflonske (Politetrafluoretilenske – PTFE) I Prihvatne Cijevi i Elektroda



Kritički faktori uređaja prikazanog na gornjoj slici:

— unutarnji promjer teflonske (PTFE) cijevi,

— duljina elektroda u odnosu na teflonsku i prihvatnu cijev; duljina bi trebala biti takva da elektrode ne dodiruju disk kože i da je elektrode pri standardnoj duljini u dodiru s otopinom $MgSO_4$,

▼**M8**

— količina otopine $MgSO_4$ u prihvatnoj cijevi trebala bi omogućiti dubinu tekućine u odnosu na razinu u teflonskoj cijevi, kako je prikazano na slici 1.,

— disk kože treba biti dobro pričvršćen na teflonsku cijev, kako bi izmjereni električni otpor vjerno odražavao svojstva kože.

▼**M8**

Dodatak

DEFINICIJE

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

C: nagrizajuće.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

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

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

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

NC: nije nagrizajuće.

OD: optička gustoća.

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

▼**M8**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M8**

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 431 (2016.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]) Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40.*bis* pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Omogućuje i djelomično daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari.

2. Procjena potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404; izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40.*bis* validirane su i donesene još dvije ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.). Nadalje, donesena je ispitna metoda *in vitro* B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) (5.) za ispitivanje potencijala nadraživanja kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).

3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrizanja kože na zdravlje ljudi. U njoj se upotrebljava rekonstruirana ljudska epiderma (RhE) (dobivena iz ljudskih netransformiranih epidermalnih keratinocita) koja vjerno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana 2013. kako bi se uključile dodatne ispitne metode u kojima se upotrebljavaju modeli RhE-a i mogućnost upotrebe metoda koje podržavaju daljnje razvrstavanje nagrizajućih kemikalija, a 2015. je ažurirana radi upućivanja na smjernice o IATA-i i uvođenja alternativnog postupka za mjerenje vijabilnosti.

4. Ova ispitna metoda obuhvaća četiri validirana komercijalno dostupna modela RhE-a. Predvalidacijske studije (7.), nakon kojih je slijedila službena validacijska studija za procjenu nagrizanja kože (8., 9. i 10.), provedene su (11. i 12.) za dva ta komercijalno dostupna ispitna modela – standardni model EpiSkin™ i test nagrizajućeg djelovanja na kožu EpiDerm™ (EPI-200) (dalje u tekstu „Validirane referentne metode – VRM-ovi”). Ishod tih studija doveo je do preporuke da bi se dvije prethodno navedene validirane referentne metode mogle upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje

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

▼M8

nagrizajućih tvari (C) od nenagrizajućih tvari (NC) i da bi se EpiSkin™ osim toga mogao upotrebljavati za daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari (13., 14. i 15.). Druga dva komercijalno dostupna ispitna modela RhE za utvrđivanje nagrizanja kože *in vitro* pokazala su rezultate slične validiranoj referentnoj metodi EpiDerm™ u skladu s validacijom na temelju zahtjeva izvedbe (16., 17. i 18.). To su SkinEthic™ RHE ([1]) i epiCS® (prethodni naziv EST-1000) te se i oni mogu upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih tvari od nenagrizajućih tvari (19. i 20.). Postvalidacijskim studijama koje su proveli proizvođači modela RhE od 2012. do 2014. s poboljšanim protokolom u kojem su ispravljene interferencije neodređene redukcije MTT-a koje uzrokuju ispitivane kemikalije poboljšana je učinkovitost razlikovanja nagrizajućih i nenagrizajućih tvari, ali i daljnjeg razvrstavanja nagrizajućih tvari (21. i 22.). Provedene su daljnje statističke analize postvalidacijskih podataka s modelima EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® kako bi se identificirali alternativni modeli predviđanja koji poboljšavaju prediktivnu sposobnost daljnjeg razvrstavanja (23.).

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

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Ova ispitna metoda omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Ovom se ispitnom metodom podržava daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari i smjesa na neobaveznu potkategoriju 1.A, u skladu s UN GHS-om (1.), te kombinaciju potkategorija 1.B i 1.C (21., 22. i 23.). Ograničenje je ove metode to što ne omogućuje razlikovanje potkategorije 1.B i potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem na kožu u skladu s UN GHS-om i CLP-om zbog ograničenog skupa poznatih kemikalija iz potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem *in vivo*. Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se odrediti daljnje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).

8. Širok raspon kemikalija, koje uglavnom čine pojedinačne tvari, ispitan je u validaciji kojom se podupiru ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu kada se upotrebljavaju za utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih kemikalija; empirijska baza podataka validacijske studije uključivala je 60 kemikalija koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8., 9. i 10.). Subjekti

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

▼M8

koji su razvili ispitnu metodu proveli su ispitivanje radi dokazivanja osjetljivosti, specifičnosti, točnosti i obnovljivosti unutar laboratorija testa za daljnje razvrstavanje, a rezultate je pregledao OECD (21., 22. i 23.). Na temelju svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitni modeli uključeni u ispitnu metodu ne mogu primijeniti za ispitivanje specifične kategorije ispitivanih kemikalija, te modele ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju ispitivanih kemikalija. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije predložene u 26.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8., 9. i 10.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

9. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za mjerenje MTT formazana (vidjeti stavke 25.–31.).

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

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.

▼M8

12. Ispitna metoda RhE temelji se na pretpostavci da nagrizajuće kemikalije mogu penetrirati kroz *stratum corneum* putem difuzije ili erozije te su citotoksične za stanice ispod tog sloja. Vijabilnost stanica mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (27.). Nagrizajuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (vidjeti stavke 35. i 36.). Pokazalo se da se ispitnom metodom za utvrđivanje nagrizanja kože koja se temelji na modelu RhE može predvidjeti nagrizajuće djelovanje na kožu *in vivo* koje je procijenjeno kod kunića u skladu s ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

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

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti (1)

Tvar	CAS br.	Kemijski razred (2)	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju *in vivo* rezultata (3)	Kat. VRM-a na temelju *in vitro* rezultata (4)	Redukcija MTT-a (5)	Agregatno stanje
Tvari koje djeluju nagrizajuće *in vivo* iz potkategorije 1.A						
Bromoctena kiselina	79-08-3	Organska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	S
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1.A	(3) 1.A	—	S
Dikloracetil klorid	79-36-7	Elektrofil	1.A	(3) 1.A	—	L
Kombinacija tvari koje djeluju nagrizajuće *in vivo* iz potkategorija 1.B i 1.C						
Monohidrat glioksilne kiseline	563-96-2	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	S
Mliječna kiselina	598-82-3	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	L
Etanolamin	141-43-5	Organska baza	1.B	(3) 1.B i 1.C	Y	Viskozno

▼**M8**

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

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

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

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

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

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

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

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

POSTUPAK

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

▼M8

jednog od tih modela u laboratoriju prouči relevantni standardni operativni postupak. Ispitivanje s četiri ispitna modela RhE obuhvaćena ovom ispitnom metodom trebalo bi biti u skladu sa sljedećim:

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

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

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

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

Tablica 2.

Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za kontrolu kvalitete šarži

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

▼M8

Funkcija barijere

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

Morfologija

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

Obnovljivost

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

Kontrola kvalitete (KK)

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

Tablica 3.

Kriteriji za kontrolu kvalitete šarže

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

▼M8

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

22. Za svaku ispitnu kemikaliju i kontrole trebala bi se upotrijebiti barem dva ponovljena tkiva za svako vrijeme izlaganja. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti najmanje 70 $\mu l/cm^2$ ili 30 mg/cm^2 kemikalije. Ovisno o modelima, površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kemikalija u krutom stanju kako bi se poboljšao kontakt ispitivane kemikalije s površinom epiderme (34., 35., 36. i 37.). Kad je god moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Metodu primjene treba prilagoditi ispitivanoj kemikaliji (vidjeti npr. upućivanja (34.–37.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo oprati s epiderme vodenom puferskom otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o tome koji se od četiri validirana ispitna modela RhE upotrebljava, upotrebljavaju se dva ili tri razdoblja izlaganja po ispitivanoj kemikaliji (za sva četiri valjana modela RhE: 3 min. i 1 sat; za EpiSkin™ dodatno vrijeme izlaganja od četiri sata). Ovisno o tome koji se ispitni model RhE upotrebljava i razdoblju izlaganja koje se procjenjuje, temperatura inkubacije tijekom izlaganja može varirati od sobne temperature do 37 °C.

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

Mjerenja vijabilnosti stanica

24. MTT test je kvantitativni test koji bi se trebao upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode (27.). Uzorak tkiva stavlja se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (0,3 ili 1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana mjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ±30 nm ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 30. i 31.) (38.).

25. Ispitivane kemikalije mogu ometati MTT test izravnom redukcijom MTT-a u plavi formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka tretiranja, u istom rasponu optičke gustoće formazana (570 ± 30 nm, uglavnom plave i ljubičaste kemikalije). Treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila moguća interferencija do koje dovode te ispitivane kemikalije, kao što su kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) i kontrola nespecifične boje (NSC) (vidjeti stavke od 26. do 30.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu te je stoga prisutna u tkivima pri provođenju MTT testa vijabilnosti. Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencija bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za ispitne modele (34., 35., 36. i 37.).

▼**M8**

26. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljeni medij MTT (34., 35., 36. i 37.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilne epiderme, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju sličnu količinu ispitivane kemikalije kao vijabilna tkiva. Svaka kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na barem dva ponovljena mrtva tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).

27. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom te kako bi se odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrahiranje). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 30. i 31.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD) svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva po vremenu izlaganja, koji se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba provoditi istodobno po vremenu izlaganja po obojenoj ispitivanoj kemikaliji (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja ($\%NSC_{living}$).

28. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 26.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 27.) pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje ometaju MTT test (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 26. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSCkilled). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne

▼**M8**

otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i $\%NSC_{living}$ te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja ($\%NSC_{killed}$).

29. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Točnije, mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ektrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferenciju s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljenim postotkom vijabilnosti dobivenim ispitivanom kemikalijom ona već utvrđena kao nagrizajuća (vidjeti stavke 35. i 36.). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili $\%NSC_{liVing}$ > 50 % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti.

30. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 31.) (37.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (38.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikad nisu potrebne kontrole NSC_{liVing} ili NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 26.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji umanjen za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti tvari koje izravno reduciraju MTT i koje ujedno mogu i interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u iznimno rijetkim slučajevima.

▼M8

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

Kriteriji prihvatljivosti

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

Tumačenje rezultata i model predviđanja

33. Vrijednosti optičke gustoće za svaku ispitivanu kemikaliju trebalo bi koristiti za izračun postotka vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Granične vrijednosti vijabilnosti stanica, izražene postotkom, koje služe za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih kemikalija (ili za razlikovanje različitih potkategorija nagrizajućeg djelovanja) navedene su u nastavku u stavcima 35. i 36. za svaki ispitni model obuhvaćen ovom ispitnom metodom i trebale bi se upotrebljavati za tumačenje rezultata.

34. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je dobiveno razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja, može se razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

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

▼M8

Tablica 4.

Model predviđanja za EpiSkin™

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

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

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

Tablica 5.

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS®

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3 i 60 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
KORAK 1 za EpiDerm™ SCT, za SkinEthic™ RHE i epiCS®	
< 50 % nakon 3 min. izlaganja	**Nagrizajuće**
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja **I** < 15 % nakon 60 min. izlaganja	**Nagrizajuće**
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja **I** ≥ 15 % nakon 60 min. izlaganja	**Nije nagrizajuće**
KORAK 2 za EpiDerm™ SCT – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 25 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 25 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za SkinEthic™ RHE – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 18 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*

▼M8

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

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

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

Izvješće o ispitivanju

38. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

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

— tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— tretiranje ispitivanih kemikalija/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

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

Ispitni uvjeti:

— model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),

▼**M8**

— informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja,

— opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,

— opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,

— potpune popratne informacije o konkretnom upotrijebljenom modelu RhE, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

i) vijabilnost;

ii) funkciju barijere;

iii) morfologiju;

iv) obnovljivost i prediktivnu sposobnost;

v) kontrole kvalitete modela,

— upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,

— dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

— pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja),

— doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih kemikalija,

— trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,

— oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

— broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola te NSMTT, NSCliving i NSCkilled, ako je primjenjivo) po vremenu izlaganja,

— opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,

— opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

— srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,

▼M8

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svako razdoblje izlaganja, svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije, ako je primjenjivo,

— ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije (ako je primjenjivo) te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,

— rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolnim kemikalijama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,

— opis drugih uočenih učinaka,

— utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York i Ženeva. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.

3. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*.

4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.

5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.

6. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6*. *ATLA* 23:219.–255.

8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471.–482.

▼**M8**

9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483.–524.

10. Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and 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. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129.–147.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.

13. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.

14. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.

15. EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. ožujka 2000.

16. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925.–929.

17. Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547.–559.

18. Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379.–1385.

19. EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 studenoga 2006.

20. EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12. lipnja 2009.

▼**M8**

21. OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

22. Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131.–145.

23. Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055.–2080.

24. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

25. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

26. Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62:393.–403.

27. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55.–63.

28. Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* U: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133.–140.

29. Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889.–891.

30. Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211.–225.

31. Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310.–319.

32. Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163.–171.

33. Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747.–756.

34. EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

35. EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

36. SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

37. EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) Cell-Systems.

38. Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741.–761.

39. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (svibanj 2001.). Dostupno na: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

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

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

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

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

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

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

▼**M8**

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

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

NC: nije nagrizajuće.

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

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

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

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

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

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

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

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

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

▼**M8**

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

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

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

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

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

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

▼M8

Dodatak 2.

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

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Broj ponavljanja uzoraka tkiva	Najmanje dva po vremenu izlaganja	2–3 po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja
Doze za tretiranje i primjena	Tekućine i viskozne kemikalije: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Krute tvari: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl otopine NaCl (9 g/l) Voskovi/ljepljive tvari: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s najlonskom mrežom	Tekućine: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s najlonskom mrežom ili bez nje *Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Polukrute tvari: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Krute tvari: 25 µl H_2O (ili po potrebi više) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Voskovi: ravni komad nalik disku promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H_2O.	Tekućine i viskozne kemikalije: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) s najlonskom mrežom *Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Krute tvari: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Voskovi/ljepljive tvari: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) s najlonskom mrežom	Tekućine: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s najlonskom mrežom *Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Polukrute tvari: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Krute tvari: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (ili po potrebi više) Voskovi: ravni komad nalik kolačiću promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H_2O
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	50 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml otopine za 180 ± 5 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 180 ± 15 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem

▼M8

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	10 µl (tekućine) ili 10 mg (krute tvari) + 90 µl H_2O miješano 15 min na sobnoj temperaturi → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H_2O za 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari) + 300 µl H_2O miješano 60 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H_2O za 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu
Vrijeme i temperatura izloženosti	3 min, 60 min (± 5 min) i 240 min (± 10 min) U ventiliranim ormarima Sobna temperatura (18–28 °C)	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %
Ispiranje	25 ml 1 x PBS (2 ml/odbacivanje)	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a
Negativna kontrola	50 µl otopine NaCl (9 g/l) Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Pozitivna kontrola	50 µl ledene octene kiseline Ispituje se samo četiri sata	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl 8N KOH Ispituje se samo 1 sat	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Otopina MTT-a	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min (±15 min) na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %

▼M8

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Ekstrakcijsko otapalo	500 µl zakiseljenog izopropanola (0,04 N HCl u izopropanolu) (potpuno uronjeno izolirano tkivo)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	Preko noći na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (545–595 nm) bez referentnog filtra	570 nm (ili 540 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	540–570 nm bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	18-satno tretiranje SDS-om 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,08 sati ≤ ET_{50} ≤ 8,7 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,0 sati ≤ ET_{50} ≤ 10,0 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 2,0 sati ≤ ET_{50} ≤ 7,0 sati
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (NaCl) trebala bi biti ≥ 0,6 i ≤ 1,5 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (ledena octena kiselina) na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 2,8 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % koeficijent varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva trebao bi biti ≤ 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 3,0 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na jedan sat (i četiri sata ako je primjenjivo), izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 2,8 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.

▼M8

Dodatak 3.

UČINKOVITOST ISPITNIH MODELA ZA DALJNJE RAZVRSTAVANJE

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

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

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

STATISTIČKI PODACI O PREDVIĐANJIMA DOBIVENI NA CIJELOM SKUPU KEMIKALIJA

(n = 80 kemikalija ispitivanih u dva neovisna ciklusa za epiCS® ili tri neovisna ciklusa za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ i SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*) odnosno 240 razvrstavanja)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Prestroga razvrstavanja:				
1.B i 1.C prestrogo razvrstani kao 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.B i 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Ispr. prestrogog razvrstavanja	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Opća stopa prestrogog razvrstavanja (sve kategorije)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Preblaga razvrstavanja:				
1.A preblago razvrstan kao 1.B i 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A preblago razvrstan kao NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B i 1.C preblago razvrstani kao NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Opća stopa preblagog razvrstavanja (sve kategorije)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Točna razvrstavanja:				
1.A točno razvrstan	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1.B i 1.C točno razvrstani	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC točno razvrstan	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Ukupna točnost	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: nije nagrizajuće

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

▼**M8**

Dodatak 4.

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

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

([1]) LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 µg/ml.;

▼B

B.41. **TEST FOTOTOKSIČNOSTI *IN VITRO* 3T3 NRU**

1. **METODA**

Ova je metoda ekvivalentna metodi iz Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 432 (2004).

1.1. UVOD

Fototoksičnost je definirana kao toksička reakcija uslijed primjene tvari na tijelo, koja je ili izazvana ili povećana (očita kod nižih razina doze) nakon naknadnog izlaganja svjetlu, ili koja je inducirana izlaganjem kože zračenju nakon sustavne primjene tvari.

Test fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU koristi se za utvrđivanje fototoksičnog potencijala ispitivane tvari koji inducira pobuđena kemikalija nakon izlaganja svjetlu. Ovim se testom foto-citotoksičnost procjenjuje relativnim smanjenjem preživljavanja stanica koje su izložene kemikaliji u prisutnosti odnosno izostanku svjetla. Tvari identificirane ovim testom vjerojatno su fototoksične *in vivo* nakon sustavne primjene na kožu i difuzije u kožu, ili nakon lokalne primjene.

Za mnoge vrste kemikalija navedeno je da izazivaju fototoksične učinke (1)(2)(3)(4). Zajednička im je osobina sposobnost apsorpcije svjetlosne energije u spektru sunčeve svjetlosti. Prema prvom zakonu fotokemije (Grotthaus-Draperov zakon), za fotoreakciju potrebna je apsorpcija dovoljnog broja kvanata svjetla. Stoga, prije nego što se razmišlja o provođenju biološkog ispitivanja, za ispitivanu tvar treba odrediti UV/vidljivi spektar apsorpcije prema Smjernici o ispitivanju OECD-a 101. Ako je koeficijent molarne ekstinkcije/apsorpcije manji od 10 litara × mol^{-1} × cm^{-1}, smatra se da kemikalija nema fotoreaktivni potencijal. Takvu kemikaliju nije potrebno podvrći testu fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU niti bilo kojem drugom biološkom ispitivanju s ciljem utvrđivanja štetnih fotokemijskih učinaka (1)(5). Također vidjeti Dodatak 1.

Pouzdanost i relevantnost testa fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU vrednovana je nedavno (6)(7)(8)(9). Pokazalo se da je testom fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU moguće predvidjeti učinke akutne fototoksičnosti kod životinja i ljudi *in vivo*. Test nije namijenjen za predviđanje drugih štetnih učinaka do kojih može doći kombiniranim djelovanjem kemikalije i svjetla, tj. test ne ispituje fotogenotoksičnost, fotoalergiju i fotokarcinogenost niti omogućuje procjenu fototoksičnog potencijala. Osim toga, ovaj je test namijenjen ispitivanju posrednih mehanizama fototoksičnosti, učinaka metabolita ispitivane tvari, ili učinaka smjesa.

Dok je upotreba metaboličkih sustava opći uvjet kod svih pokusa *in vitro* koji se koriste za predviđanje genotoksičkog i karcinogenog potencijala, kad se radi o fototoksikologiji, do sada je poznat tek poneki rijetki primjer kemikalije kojoj je potrebna metabolička transformacija kako bi mogla djelovati kao fototoksin *in vivo* ili *in vitro*. Stoga se smatra da u prisutnosti sustava metaboličke aktivacije ovaj test nije potrebno niti je znanstveno opravdano provoditi.

▼B

1.2. DEFINICIJE

Zračenje: jakost pojave ultraljubičastog (UV) ili vidljivog svjetla na nekoj površini, mjerena u W/m^2 ili mW/cm^2.

Doza svjetla: količina (= jakost × vrijeme) pojave ultraljubičastog (UV) ili vidljivog zračenja na nekoj površini, izražena u džulima (= W × s) po jedinici površine, npr. J/m^2 ili J/cm^2.

Valne duljine UV svjetla: oznake koje preporuča Međunarodna komisija za osvjetljenje, CIE (Commission International de l'Eclairage) su: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) i UVC (100-280 nm). Koriste se i druge oznake; podjela između UVB i UVA obično se postavlja na 320 nm, a UVA se može podijeliti na UV-A1 i UV-A2 s podjelom na oko 340 nm.

Preživljavanje stanica: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica (npr. ugradnja vitalne boje Neutral Red u stanične lizosome) koji, u zavisnosti o mjerenom kriteriju i izvedbi testa koji se upotrebljava, korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću stanica.

Relativno preživljavanje stanica: preživljavanje stanica izraženo u odnosu na kontrole otapala (negativne) tijekom cijelog ispitnog postupka (bilo + Irr ili –Irr), ali bez tretiranja ispitivanom kemikalijom.

PIF (Photo Irritation Factor – faktor foto-nadražujućeg djelovanja): faktor koji se dobije usporedbom dvije jednako učinkovite citotoksične koncentracije (IC_{50}) ispitivane kemikalije dobivene bez prisutnosti (-Irr) i u prisutnosti (+ Irr) necitotoksičnog zračenja UVA/vidljivog svjetla.

IC_{50}: koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je preživljavanje stanice smanjeno 50 %.

MPE (Mean Photo Effect – srednji foto učinak): mjerenje izvedeno iz matematičke analize krivulja reakcija na koncentracije dobivene bez prisutnosti (-Irr) i u prisutnosti (+ Irr) necitotoksičnog zračenja UVA/vidljivog svjetla.

Fototoksičnost: akutna toksička reakcija koja je izazvana nakon prvog izlaganja kože određenim kemikalijama i naknadnog izlaganja svjetlu, ili koja je inducirana na sličan način zračenjem kože nakon sustavne primjene tvari.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Test fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU temelji se na usporedbi citotoksičnosti kemikalije kad se testira sa i bez izlaganja necitotoksičnoj dozi simuliranog sunčevog svjetla. Citotoksičnost se u ovom testu izražava kao redukcija, u zavisnosti od koncentracije, ugradnje vitalne boje Neutral Red mjerena 24 sata nakon tretiranja ispitivanom kemikalijom i zračenja (10). NR je slaba kationska boja koja brzo penetrira kroz stanične membrane nedifuzno i nakuplja se međustanično u lizosomima. Promjenama na površini osjetljive lizosomske membrane, lizosomi postaju krhki i nastaju druge promjene koje postupno postaju nepopravljive. Te promjene izazvane djelovanjem ksenobiotika rezultiraju smanjenom ugradnjom i vezivanjem NR. Stoga je moguće razlikovati žive, oštećene ili mrtve stanice, na čemu se temelji ovaj test.

▼B

Stanice Balb/c 3T3 održavaju se u kulturi 24 sata radi formiranja monoslojeva. Za svaku ispitivanu tvar, dvije ploče s 96 bunarića prethodno se inkubira s osam različitih koncentracija ispitivane tvari u trajanju od 1 h. Nakon toga se jedna od te dvije ploče izlože najvišoj dozi necitotoksičnog zračenja, dok se druga ploča drži na tamnom mjestu. U obje ploče tretirani medij zatim se zamijeni hranjivom podlogom za uzgoj kultura i nakon sljedećih 24 sata inkubacije, određuje se preživljavanje stanica ugradnjom boje Neutral Red. Preživljavanje stanica izražava se kao postotak netretiranih kontrola otapala i izračunava se za svaku ispitnu koncentraciju. Za predviđanje fototoksičnog potencijala, reakcije na koncentracije dobivene sa i bez zračenja uspoređuju se, obično na razini IC_{50}, s tim da se koncentracija koja smanjuje preživljavanje stanica na 50 % uspoređuje s netretiranim kontrolama.

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Pripravci**

1.4.1.1. *Stanice*

U validacijskoj studiji upotrijebljena je stalna stanična linija mišjih fibroblasta, Balb/c 3T3, klon 31, bilo iz zbirke American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, SAD, ili iz zbirke European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Ujedinjena Kraljevina, pa se stoga preporuča nabaviti stanice iz dobro kvalificiranog depozitorija stanica. Uz isti ispitni postupak mogu se koristiti druge stanice i stanične linije ako su uvjeti kulture prilagođeni posebnim potrebama stanica, ali ekvivalentnost se mora dokazati.

Stanice treba redovito provjeravati kako bi se potvrdilo da nisu kontaminirane mikoplazmama i koristiti samo ako nijedna nije utvrđena (11).

Važno je redovito provjeravati osjetljivost stanica na UV zračenje u skladu s postupkom kontrole kvalitete opisanoj u ovoj metodi. Kako osjetljivost stanica na UVA zrake može porasti s brojem prolaza, treba upotrebljavati stanice Balb/c 3T3 s najnižim brojem prolaza koji se može postići, poželjno manjim od 100. (Vidjeti odjeljak 1.4.2.2.2. i Dodatak 2.).

1.4.1.2. *Uvjeti koje moraju zadovoljavati mediji i kulture*

Za rutinski prolaz kroz stanice i tijekom ispitnog postupka treba koristiti odgovarajuće hranjive podloge za uzgoj kulture i odgovarajuće uvjete inkubacije, npr. za stanice Balb/c 3T3 to je podloga DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) obogaćena 10 %-tnim serumom novorođenog teleta, 4 nM glutamina, pencilinom (100 JU), i streptomicinom (100 μg/ml), te vlažnu inkubaciju na 37 °C, sa sadržajem CO_2 od 5 do 7,5 % u zavisnosti od puferske otopine (vidjeti odjeljak 1.4.1.4., drugi stavak). Posebno je važno da uvjeti uzgoja stanične kulture dozvole da se trajanje staničnog ciklusa održi u normalnim povijesnim granicama za stanice ili stanične linije.

1.4.1.3. *Priprema kultura*

Stanice iz zamrznutih matičnih kultura nasade se na hranjivu podlogu za uzgoj kultura odgovarajućom gustoćom i ponovno presiju najmanje jednom prije nego se upotrijebe u testu fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Stanice koje se koriste za test fototoksičnosti nasade se na hranjivu podlogu za uzgoj kultura tolikom gustoćom da kulture ne dosegnu konfluenciju do kraja ispitivanja, tj. kad se utvrđuje preživljavanje stanica, 48 sati nakon sijanja stanica. Za stanice Balb/c 3T3 koje se uzgajaju na pločama s 96 bunarića, preporuča se gustoća nasada 1×10^4 stanica po bunariću.

Za svaku ispitivanu kemikaliju stanice se na isti način nasade u dvije odvojene ploče s 96 bunarića koje se zatim paralelno koriste tijekom cijelog ispitnog postupka, u identičnim uvjetima kulture osim za vrijeme u kojem je jedna ploča izložena zračenju (+ Irr), a druga je držana u mraku (-Irr).

1.4.1.4. *Priprema ispitivane tvari*

Ispitivane se tvari moraju pripremati svježe, neposredno prije uporabe, osim ako postoje podaci o njihovoj stabilnosti kod skladištenja. Preporuča se da se svako rukovanje kemikalijom i početna obrada stanica provedu u takvim uvjetima svjetla kojima će se izbjeći fotoaktivacija ili razgradnja ispitivane tvari prije izlaganja zračenju.

Ispitivane kemikalije treba otopiti u slanim puferskim otopinama, npr. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), ili drugim fiziološki uravnoteženim puferskim otopinama koje ne smiju sadržavati sastojke bjelančevina, sastojke koji apsorbiraju svjetlo (npr. ph-indikatorske boje i vitamine) kako bi se izbjegla interferencija tijekom izlaganja zračenju. Kako se tijekom izlaganja zračenju stanice otprilike 50 minuta drže izvan inkubatora CO_2, treba paziti da se izbjegne alkalizacija. Ako se koriste slabi puferi poput EBSS, to se može postići inkubiranjem stanica na 7,5 % CO_2. Ako se stanice inkubiraju na samo 5 % CO_2, treba odabrati jači pufer.

Ispitivane kemikalije ograničene topljivosti treba otopiti u odgovarajućem otapalu. Ako se koristi otapalo, ono mora u svim kulturama biti prisutno u stalnom volumenu, tj. u negativnim kontrolama (otapalo) kao i u svim koncentracijama ispitivane kemikalije, i kod tih koncentracija ne smije biti toksično. Koncentracije ispitivane tvari treba odabrati na način da se izbjegne nastajanje taloga ili mutnih otopina.

Kao otapala preporučaju se dimetilsulfoksid (DMSO) i etanol (ETOH). I druga otapala male citotoksičnosti mogu biti primjerena. Prije uporabe, za svako otapalo treba procijeniti posebna svojstva, npr. reakciju s ispitivanom kemikalijom, ublažavanje fototoksičnog učinka, svojstva fiksiranja radikala i/ili kemijsku stabilnost u otapalu.

Ako to ne utječe na stabilnost ispitivane kemikalije, za bolju topljivost može se primijeniti vrtložno miješanje i/ili sonikacija i/ili zagrijavanje na odgovarajuće temperature

▼B

1.4.1.5. *Uvjeti izlaganja zračenju*

1.4.1.5.1. Izvor svjetlosti

Izbor odgovarajućeg izvora svjetlosti i filtra ključni je čimbenik kod ispitivanja fototoksičnosti. Svjetlo iz UVA i vidljivog područja obično se povezuje s fototoksičkim reakcijama *in vivo* (3)(12), budući da je svjetlo iz UVB područja obično manje važno, ali jako citotoksično; između vrijednosti valne duljine od 313 do 280 nm (13), citotoksičnost se povećava 1 000 puta. Jedan od kriterija za odabir odgovarajućeg izbora svjetla mora biti uvjet da izvor svjetlosti emitira valne duljine koje ispitivana kemikalija apsorbira (spektar apsorpcije) i da je doza svjetla (koju je moguće postići u razumnom vremenu izlaganja) bude dovoljna za utvrđivanje poznatih fototoksičnih kemikalija. Nadalje, valne duljine i doze koje se primjenjuju ne smiju nepotrebno štetno djelovati na ispitni sustav, npr. emisija topline (infracrveno područje).

Simulacija sunčeve svjetlosti solarnim simulatorima smatra se optimalnim izvorom umjetnog svjetla. Distribucija snage filtriranog zračenja solarnog simulatora treba biti slična distribuciji vanjskog dnevnog svjetla navedenog u (14). Kao solarni simulatori (15) koriste se i ksenonovi lukovi i lukovi (dopirani) metalnog halida žive. Prednost ovog potonjeg je u tome što emitira manje topline i jeftiniji je, ali sličnost sa sunčevom svjetlošću je manja nego kod ksenonovog luka. Budući da svi solarni simulatori emitiraju znatne količine UVB zraka treba ih opremiti odgovarajućim filtrima kako bi se ublažile njihove jako toksične UVB valne duljine. Kako plastični materijali za stanične kulture sadrže UV stabilizatore, spektar treba mjeriti kroz poklopac ploče s 96 bunarića istog tipa koji će se koristiti u pokusu. Neovisno o mjerama koje se poduzimaju za ublažavanje dijelova spektra filtriranjem ili neizbježnim filtar djelovanjem opreme, spektar koji se bilježi ispod tih filtara ne bi trebao odstupati od standardnog dnevnog svjetla (14). Primjer distribucije filtriranog zračenja spektra solarnog simulatora koji se koristi u validacijskoj studiji testa fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU naveden je u (8)(16). Vidjeti također Dodatak 2., sliku 1.

1.4.1.5.2. Dozimterija

Prije svakog testa fototoksičnosti, jakost svjetla (zračenje) treba redovito provjeravati pomoću odgovarajućeg širokopojasnog UV-metra. Jakost treba mjeriti kroz poklopac ploče s 96 bunarića istog tipa koji će se koristiti u pokusu. UV-metar mora biti kalibriran prema izvoru. Rad UV-metra treba provjeravati, a u tu svrhu preporuča se rabiti drugi, referentni UV-metar istog tipa i identične kalibracije. Idealno je, u većim intervalima, za mjerenje zračenja spektra filtriranog izvora svjetla i za kalibriranje širokopojasnog UV-metra koristiti spektroradiometar.

Doza od 5 J/cm^2 (izmjerena u UVA području) određena je kao netoksična za stanice Balb/c 3T3, ali s dovoljnim potencijalom da pobudi kemikalije da izazovu fototoksične reakcije, (6)(17) npr. kako bi se postiglo 5 J/cm^2 u vremenu od 50 min, zračenje je podešeno na 1,7 mW/cm^2. Vidjeti Dodatak 2., sliku 2. Ako se koristi druga stanična linija ili drugačiji izvor svjetla, dozu zračenja možda će trebati kalibrirati kako bi se mogao odabrati režim doziranja koji ne djeluje štetno na stanice, ali je dostatan za pobudu standardnih fototoksina. Vrijeme izlaganja svjetlu izračunava se na sljedeći način:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{doza zračenja } (J/cm^2) \times 1000}{\text{gustoća zračenja } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ \text{J} = 1\ \text{Ws})$$

1.4.2. **Uvjeti ispitivanja**

1.4.2.1. *Koncentracije ispitivane tvari*

Raspon koncentracija tvari ispitivane u prisutnosti (+ Irr) i bez prisutnosti (-Irr) svjetla određuje se na odgovarajući način u pokusima za određivanje raspona doze. Topljivost može biti korisno procijeniti na početku i nakon 60 min (ili već prema vremenu tretiranja koje se će se koristiti), jer se topljivost može promijeniti u vremenu ili tijekom izlaganja. Kako bi se izbjegla toksičnost inducirana držanjem kulture u nepravilnim uvjetima ili uzrokovana jako kiselim ili alkalnim kemikalijama, pH vrijednost staničnih kultura kojima se dodaje ispitivana tvari treba biti u području 6,5 – 7,8.

Najviša koncentracija ispitivane tvari treba biti unutar fizioloških uvjeta ispitivanja, npr. osmotički i pH šok treba izbjegavati. Ovisno o ispitivanoj tvari, kao čimbenike koji ograničavaju najvišu ispitnu koncentraciju možda će trebati uzeti u obzir druga fizikalno-kemijska svojstva. Za relativno netopljive tvari koje nisu toksične u koncentracijama do točke zasićenja treba testirati najvišu koncentraciju koja se može postići. Općenito, u svim ispitnim koncentracijama treba izbjeći taloženje ispitivane kemikalije. Maksimalna koncentracija ispitivane tvari ne bi smjela biti veća od 1 000 μg/ml; osmolarnost ne smije prijeći 10 mmolar. Treba koristiti geometrijski niz od osam koncentracija ispitivane tvari stalnog faktora razrjeđenja (vidjeti odjeljak 2.1., drugi stavak).

Ako postoji informacija (iz pokusa za određivanje raspona doze) da ispitivana kemikalija do granične koncentracije nije citotoksična u pokusu u mraku (-Irr), ali je jako citotoksična kad je izložena zračenju (+ Irr), kako bi se zadovoljio uvjet za odgovarajućom kvalitetom podataka, rasponi koncentracija koji se odabiru za pokus u mraku (+ Irr) mogu se razlikovati od raspona koncentracija odabranih za pokus s izlaganjem zračenju (-Irr).

1.4.2.2. *Kontrole*

1.4.2.2.1. Osjetljivost stanica na zračenje, utvrđivanje povijesnih podataka:

Kod stanica redovito (otprilike svaki peti prolaz) treba provjeravati osjetljivost na izvor svjetla procjenom njihovog preživljavanja nakon izlaganju povećanim dozama zračenja. U toj procjeni treba koristiti nekoliko doza zračenja, uključujući i razine znatno veće od razina koje se koriste u testu fototoksičnosti 3T3 NRU. Količina tih doza najlakše se odredi mjerenjem UV dijelova izvora svjetla. Stanice se nasade gustoćom koja se rabi u testu fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU i sljedeći dan izlože se zračenju. Dan kasnije određuje se preživljavanje stanica na temelju apsorpcije boje Neutral Red. Treba dokazati da je najviša netoksična doza koja je dobivena kao rezultat (npr. u validacijskoj studiji: 5 J/cm^2 (UVA)) dovoljna za ispravnu klasifikaciju referentnih kemikalija (Tablica 1.).

▼B

1.4.2.2.2. Osjetljivost na zračenje, provjera testa koji je u tijeku:

Test zadovoljava kriterije kvalitete ako se u ozračenim negativnim kontrolama (otapalima) postiže preživljavanje veće od 80 % u usporedbi s neozračenim negativnim kontrolama (otapalima).

1.4.2.2.3. Preživljavanje kod negativnih kontrola:

Apsolutna optička gustoća ($OD_{540\ NRU}$) boje Neutral Red ekstrahirane iz negativnih kontrola pokazuje je li 1×10^4 stanica nasađenih po bunariću naraslo s normalnim vremenom dupliciranja u dvodnevnom razdoblju provođenja testa. Test zadovoljava kriterije prihvatljivosti ako je srednja optička gustoća $OD_{540\ NRU}$ netretiranih kontrola ≥ 0,4 (tj. približno 20 puta veća od osnovne apsorbancije otapala).

1.4.2.2.4. Pozitivna kontrola:

Istodobno sa svakim testom fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU treba ispitati neku poznatu fototoksičnu kemikaliju. Preporuča se da to bude klorpromazin (CPZ). Za CPZ koji se u testu fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU testira standardnim protokolom definirani su sljedeći kriteriji prihvatljivosti testa: CPZ izložen zračenju (+ Irr): IC_{50} = 0,1 do 2,0 μg/ml, CPZ koji nije izložen zračenju (-Irr): IC_{50} = 7,0 do 90,0 μg/ml. Faktor foto-nadražujućeg djelovanja Photo Irritation Factor (PIF) treba biti > 6. Treba pratiti povijesne podatke pozitivne kontrole.

Kao paralelne pozitivne kontrole umjesto klorpromazina mogu se koristiti druge kemikalije koje u pogledu kemijske klase ili karakteristika topljivosti odgovaraju kemikaliji koja se procjenjuje.

1.4.3. **Ispitni postupak (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1. *Prvi dan:*

Uliti 100 μL hranjive podloge za uzgoj kultura u periferne bunariće mikrotiter ploče s 96 bunarića s tkivom kulture (= slijepe probe). U preostale bunariće uliti 100 μL stanične suspenzije sa sadržajem 1×10^5 stanica/ml u hranjivoj podlozi za uzgoj stanica (= 1×10^4 stanica/bunariću). Za svaki niz koncentracija pojedine ispitivane kemikalije i za otapalo i pozitivne kontrole treba pripremiti dvije ploče.

Inkubirati stanice 24 sata (vidjeti odjeljak 1.4.1.2.) dok se ne združe u polu-konfluentan monosloj. Takvo vrijeme inkubacije osigurava rekuperaciju, prianjanje i eksponencijalni rast stanica.

1.4.3.2. *Drugi dan:*

Nakon inkubacije, dekantirati hranjivu podlogu iz stanica i oprezno oprati s 150 μL puferske otopine koja je korištena za inkubaciju. Dodati 100 μL pufera koji sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivane kemikalije ili otapala (kontrola otapala). Primijeniti osam različitih koncentracija ispitivane kemikalije. Inkubirati stanice s ispitivanom kemikalijom u mraku 60 minuta (vidjeti odjeljak 1.4.1.2. i 1.4.1.4., drugi stavak).

Od dvije ploče priređene za svaki niz koncentracija ispitivane tvari i kontrola, izabrati jednu, obično nasumice, za određivanje citotoksičnosti (-Irr) (tj. kontrolnu ploču), i jednu (tretiranu ploču) za određivanje citotoksičnosti (+ Irr).

▼B

Za provođenje izlaganja + Irr, izložiti zračenju stanice na sobnoj temperaturi tijekom 50 minuta, kroz poklopac ploče s 96 bunarića s najvišom dozom zračenja koja nije citotoksična (vidjeti također Dodatak 2.). Držati neozračene ploče (-Irr) na sobnoj temperaturi u mračnoj kutiji tijekom 50 min (= vrijeme izlaganja svjetlu).

Dekantirati ispitnu otopinu i pažljivo oprati dva puta sa 150 µl puferske otopine koja je korištena za inkubaciju, ali koja ne sadrži ispitivani materijal. Zamijeniti pufer s hranjivom podlogom i inkubirati (vidjeti odjeljak 1.4.1.2.) preko noći (18-22 h).

1.4.3.3. *Treći dan:*

1.4.3.3.1. Mikroskopska procjena

Rast i morfologiju stanica te integritet monosloja treba pregledati faznim kontrastnim mikroskopom. Promjene u morfologiji stanica i učinke na rast stanica treba zabilježiti.

1.4.3.3.2. Test ugradnje boje Neutral Red

Oprati stanice s 150 µl prethodno zagrijane puferske otopine. Odstraniti otopinu za pranje nježnim tapkanjem. Dodati 100 µl 50 µg/ml boje Neutral Red (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorida, EINECS br. 209-035-8; CAS br. 553-24-2; C.I. 50040) u medij bez seruma (16) i 3 sata inkubirati kako je opisano u stavku 1.4.1.2. Nakon inkubacije, odstraniti medij NR, oprati stanice s 150 µl puferske otopine. Dekantirati i odstraniti preostali pufer blotiranjem ili centrifugiranjem.

Dodati točno 150 µl pufer otopine boje NR (svježe pripremljene od 49 dijelova vode + 50 dijelova etanola + 1 dio octene kiseline).

Nježno tresti mikrotiter ploču na tresalici mikrotiter ploče u trajanju od 10 minuta dok se NR ne ekstrahira iz stanica i ne formira homogenu otopinu.

Izmjeriti optičku gustoću ekstrakta NR na 540 nm u spektrofotometru, koristeći slijepe probe kao referencu. Pohraniti podatke u odgovarajućem formatu elektronske datoteke za naknadnu analizu.

2. **PODACI**

2.1. KVALITETA I KVANTITETA PODATAKA

Rezultati testa trebaju omogućiti smislenu analizu odnosa koncentracije-reakcije u prisutnosti i bez prisutnosti zračenja, i po mogućnosti koncentracije ispitivane kemikalije kod koje se preživljavanje stanica smanjuje na 50 % (IC_{50}). Ako se utvrdi citotoksičnost, treba podesiti i raspon koncentracija i interval između svake koncentracije, kako bi krivulja bila u skladu s eksperimentalnim podacima.

I za jasno pozitivne i jasno negativne rezultate (vidjeti odjeljak 2.3., prvi stavak), možda je dovoljan samo primarni pokus, uz jedan ili više pokusa provedenih s ciljem utvrđivanja raspona preliminarne doze).

▼B

Dvosmislene, granične ili nejasne rezultate treba pojasniti daljnjim ispitivanjem (također vidjeti odjeljak 2.4., drugi stavak). U takvim slučajevima treba razmisliti o eventualnim modifikacijama pokusnih uvjeta. Među pokusnim uvjetima koji se mogu mijenjati su raspon koncentracija ili interval između dvije koncentracije, vrijeme predinkubacije i vrijeme izlaganja zračenju. Za kemikalije nestabilne u vodi može biti prikladno kraće vrijeme izlaganja.

2.2. VREDNOVANJE REZULTATA

U svrhu vrednovanja podataka mogu se izračunati faktor foto-nadražujućeg djelovanja (Photo Irritation Factor - PIF) ili srednji foto učinak (Mean Photo Effect – MPE).

Za izračun mjerila fototoksičnosti (vidjeti dolje), set proizvoljnih vrijednosti koncentracija-reakcija treba uskladiti na temelju odgovarajuće stalne krivulje koncentracija-reakcija (model). Usklađivanje krivulje prema podacima provodi se metodom nelinearne regresije (18). Za procjenu kako varijabilnost podataka utječe na usklađenu krivulju preporuča se samodopunjujući, tzv. „bootstrap” postupak.

Faktor foto-nadražujućeg djelovanja (Photo Irritation Factor - PIF) izračunava se na temelju sljedeće formule:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Ako IC_{50} u ili bez prisutnosti svjetla nije moguće izračunati, za ispitivani materijal nije moguće odrediti faktor PIF. Srednji foto učinak (MPE) temelji se na usporedbi svih krivulja koncentracija-reakcija (19). On se definira kao ponderirani prosjek reprezentativnog seta vrijednosti foto učinaka.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Foto učinak PE_C kod neke koncentracije C definira se kao produkt učinka reakcije RE_C i učinka doze DE_C, tj. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Učinak reakcije RE_C razlika je između reakcija zapaženih bez i u prisutnosti svjetla tj. $RE_C = R_C$ (-Irr) – R_C (+ Irr). Odnos doza-učinak izračunava se iz:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

gdje C^* predstavlja koncentraciju ekvivalencije tj. koncentraciju na kojoj je reakcija + Irr jednaka reakciji –Irr kod koncentracije C. Ako C^* nije moguće odrediti jer su vrijednosti reakcije krivulje + Irr sustavno više ili niže od R_C (-Irr), učinak doze se podešava na 1. Faktori ponderiranja w_i određeni su vrijednošću najveće reakcije, tj. w_i = MAX {R_i (+ Irr), R_i (-Irr)}. Mreža koncentracija C_i odabrana je na način da isti broj točaka pada u svaki od intervala koncentracija definiran vrijednostima koncentracija koje se rabe u pokusu. Izračun srednjeg foto učinka MPE ograničen je na maksimalnu vrijednost koncentracije na kojoj najmanje jedna od dvije krivulje i dalje pokazuje vrijednost reakcije od najmanje 10 %. Ako je ta maksimalna vrijednost koncentracije veća od najveće koncentracije koja je upotrijebljena u pokusu + Irr, preostali dio krivulje + Irr podešava se na vrijednost reakcije „0”. Ovisno o tomu je li vrijednost MPE veća od pravilno odabrane granične vrijednosti (MPE_C = 0,15) ili nije, kemikalija se klasificira kao fototoksična.

▼B

Računalni programski paket za izračun vrijednosti PIF i MPE dostupan je iz (20).

2.3. TUMAČENJE REZULTATA

Na temelju validacijske studije (8), za ispitivanu tvar čije su vrijednosti PIF < 2 ili MPE < 0,1 smatra se da „fototoksičnosti nema”. PIF > 2 i < 5 ili MPE > 0,1 i < 0,15 pokazatelji su „vjerojatne fototoksičnosti”; a PIF > 5 ili MPE > 0,15 predviđaju „fototoksičnost”.

Tablica 1.

Naziv kemikalije	EINECS br.	CAS br.	PIF	MPE	Granična vrijednost apsorpcije	Otapalo ([1])
Amiodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,2-0,54	242 nm 300 nm (zakrivljeni dio krivulje)	etanol
Kloropromazin HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloksacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfirin IX, dinatrij	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidin		[7006-35-1]	nema faktora PIF	0,05-0,10	211 nm	voda
Heksaklorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (zakrivljeni dio krivulje)	etanol
Natrijev lauril sulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	nema apsorpcije	voda

([1]) Otapalo koje se koristi za mjerenje apsorpcije.

2.4. TUMAČENJE PODATAKA

Ako su fototoksični učinci opaženi samo kod najviše ispitne koncentracije (posebno za ispitivane kemikalije koje su topljive u vodi), za procjenu rizika mogu biti potrebna dodatne analize. To može uključivati podatke o apsorpciji kože, i akumulaciji kemikalije u koži i/ili podatke iz drugih testova, npr. ispitivanja kemikalije *in vitro* na koži životinja i ljudi, ili modelima kože.

▼B

Ako toksičnost nije dokazana (+ Irr i –Irr) i ako je slaba topljivost ograničila koncentracije koje su mogle biti ispitane, možda je prikladnost testa za dotičnu ispitivanu tvar upitna, pa treba predvidjeti potvrdno ispitivanje, npr. upotrebom nekog drugog modela.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

ispitivana tvar:

— identifikacijski podaci, opći generički nazivi i IUPAC i CAS broj, ako je poznat,

— fizikalna priroda i čistoća,

— fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provođenje studije,

— spektar apsorpcije UV/vidljivog svjetla,

— stabilnost i fotostabilost, ako je poznata.

Otapalo:

— opravdanost izbora nosača,

— topljivost ispitivane kemikalije u otapalu,

— postotak prisutnosti otapala u mediju u kojem se vrši tretiranje.

Stanice:

— vrsta i izvor stanica,

— nepostojanje mikoplazama,

— broj prolaza kroz stanicu, ako je poznat,

— osjetljivost stanica na zračenje utvrđena opremom za izlaganje zračenju koja se koristi u testu fototoksičnosti *in vitro* 3T3 NRU.

Uvjeti ispitivanja (1); *inkubacija prije i nakon tretiranja:*

— vrsta i sastav hranjive podloge za uzgoj kulture,

— uvjeti inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlaga),

— trajanje inkubacije (prije tretiranja; poslije tretiranja),

Uvjeti ispitivanja (2); *tretiranje kemikalijom:*

— razlog za odabir koncentracija ispitivane kemikalije koje se koriste u i bez prisutnosti zračenja,

— u slučaju ograničene topljivosti ispitivane kemikalije i izostanka citotoksičnosti: obrazloženje razloga za odabir najviše ispitivane koncentracije,

— vrsta i sastav medija u kojem se vrši tretiranje (puferirana slana otopina),

— trajanje tretiranja kemikalije.

Uvjeti ispitivanja (3); *izlaganje zračenju:*

— obrazloženje razloga za odabir izvora svjetla koji je upotrijebljen,

▼B

— proizvođač i tip izvora svjetla i radiometra,

— spektralne karakteristike zračenja izvora svjetla,

— karakteristike upotrijebljenih filtra u pogledu transmisije i apsorpcije,

— karakteristike radiometra i pojedinosti o njegovoj kalibraciji,

— udaljenost izvora svjetla od ispitnog sustava,

— gustoća zračenja UVA na toj udaljenosti, izražena u mW/cm^2,

— trajanje izlaganja UV/vidljivom svjetlu,

— doza UVA zračenja (gustoća zračenja × vrijeme), izražena u mJ/cm^2,

— temperatura staničnih kultura za vrijeme izlaganja zračenju i staničnih kultura koje su istodobno držane u mraku.

Uvjeti ispitivanja (4); *test preživljavanja pomoću boje Neutral Red:*

— sastav medija za tretiranje bojom Neutral Red,

— trajanje inkubacije u boji Neutral Red,

— uvjeti inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlaga),

— uvjeti ekstrakcije boje Neutral Red (sredstvo za ekstrakciju; trajanje)

— valna duljina upotrijebljena za spektrofotometrijsko očitanje optičke gustoće boje Neutral Red,

— druga valna duljina (referentna), ako je upotrijebljena,

— sadržaj uzorka namijenjen slijepoj probi spektrofotometra, ako je upotrijebljen.

Rezultati:

— preživljavanje stanica kod svake koncentracije ispitivane tvari, izraženo u postotku preživljavanja srednje vrijednosti paralelnih kontrola otapala,

— krivulje reakcije na koncentraciju (koncentracija ispitivane kemikalije – relativno preživljavanje stanica) u paralelnim pokusima + Irr i -Irr,

— analiza krivulje koncentracija-reakcija; po mogućnosti, izračun/određivanje IC_{50} (+ Irr) i IC_{50} (-Irr),

— uspoređivanje dviju krivulje reakcije na koncentracije dobivene bez i u prisutnosti zračenja, bilo izračunom faktora foto-nadražujućeg djelovanja PIF (Photo Irritation Factor), ili izračunom srednjeg foto učinka MPE (Mean Photo Effect),

— kriteriji prihvatljivosti testa; paralelna kontrola otapala:

— apsolutno preživljavanje (optička gustoća ekstrakta Neutral Red) ozračenih i neozračenih stanica,

— povijesni podaci o negativnim kontrolama i kontrolama otapala; srednje vrijednosti i standardna odstupanja,

— kriteriji prihvatljivosti testa; paralelna pozitivna kontrola,

▼B

— IC_{50} (+ Irr) i IC_{50} (-Irr) i vrijednosti faktora PIF/MPE pozitivne kontrolne kemikalije,

— povijesni podaci za kemikaliju u pozitivnoj kontroli: IC_{50} (+ Irr) i IC_{50} (-Irr) i PIF/MPE; srednje vrijednosti i standardna odstupanja.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Lovell W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology *In Vitro* 7, str. 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G., (1972) List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p. XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, str. 314-348.

(4) Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In „The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, str. 79-110.

(5) OECD, (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, str. 793-796.

(7) Anon, (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, str. 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology *In Vitro* 12, str. 305-327.

(9) OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, str. 119-124.

(11) Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, str. 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A., (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, str. 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M., (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, str. 1825-1829.

(14) ISO 10977., (1993) Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. str. 18.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U., (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, str. 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, str. 127-138.

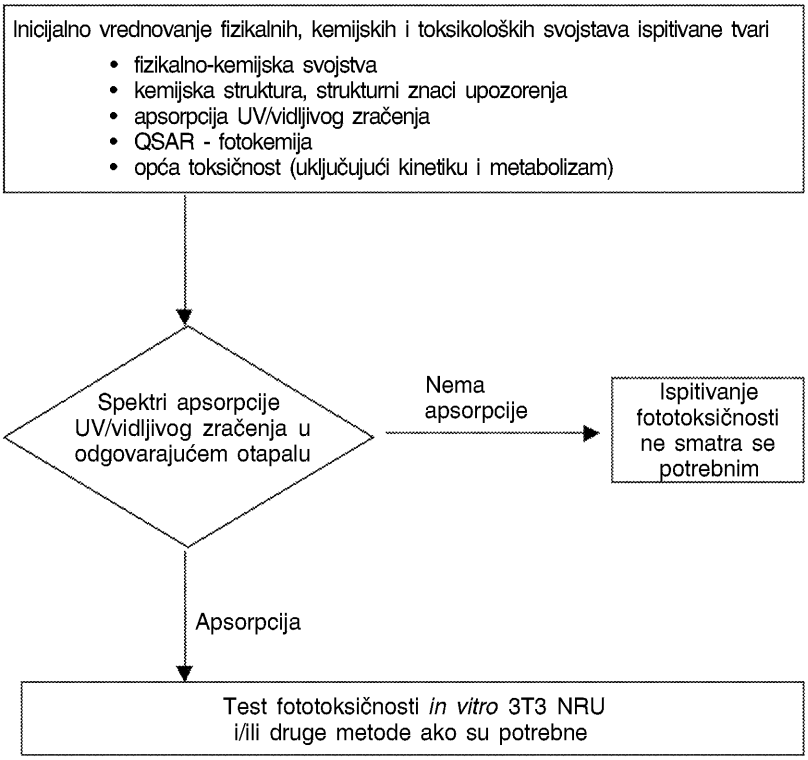
(19) Holzhütter, H.G., (1997) A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, str. 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

Dodatak 1.

Uloga testa fototoksičnosti 3T3 NRU u sekvencijalnom pristupu ispitivanju fototoksičnosti kemikalija

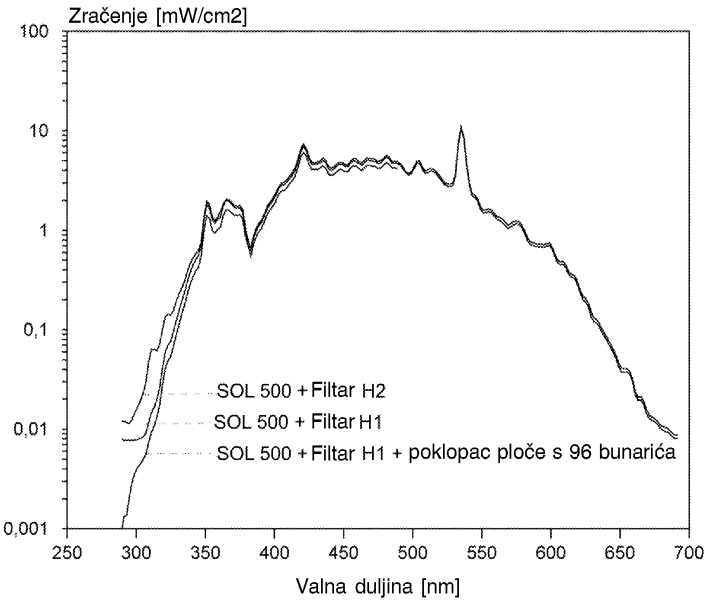


▼B

Dodatak 2.

Slika 1.

Spektralna distribucija energije na solarnom simulatoru opremljenom filtrom



(vidjeti odjeljak 1.4.1.5., drugi stavak)

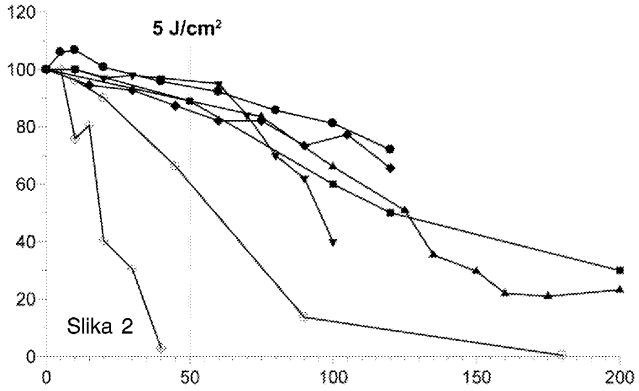
Slika 1. prikazuje primjer prihvatljive distribucije spektralnog zračenja na solarnom simulatoru opremljenom filtrom. Zračenje dolazi iz izvora dopiranog metalnog halida koji je korišten u validacijskom pokusu testa fototoksičnosti 3T3 NRU (6)(8)(17). Prikazan je učinak dva različita filtra i učinak dodatnog filtriranja poklopca ploče s 96 bunarića za stanične kulture. Filtar H2 koristi se samo kod ispitnih sustava koji podržavaju veću količinu zračenja UVB (test na modelu kože i test fotohemolize stanica crvenih krvnih zrnaca. U testu fototoksičnosti 3T3 NRU korišten je filtar H1. Slika prikazuje da se učinak dodatnog filtriranja poklopca ploče uglavnom opaža u UVB području, s tim da u spektru ostaje još uvijek dovoljno UVB zračenja za pobuđivanje kemikalija koje obično apsorbiraju svjetlo u UVB području, kao što je amiodaron (vidjeti tablicu 1.).

▼B

Slika 2.

Osjetljivost stanica Balb/c 3T3 na zračenje (mjerena u području UVA)

Sposobnost preživljavanja stanice (% postotak apsorpcije neutralnog crvenila za kontrole u mraku)



vrijeme izlaganja zračenju (minute)

(10 min = 1 džul UVA/cm²

(vidjeti odjeljke 1.4.1.5.2., drugi stavak; 1.4.2.2.1., 1.4.2.2.2.)

Osjetljivost stanica Balb/c 3T3 na izloženost zračenju iz solarnog simulatora opremljenog filtrom koji je korišten u validacijskom pokusu testa fototoksičnosti 3T3 NRU, mjerena u području UVA. Slika prikazuje rezultate dobivene u sedam različitih laboratorija u predvalidacijskog studiji (1). Dok su dvije krivulje s prozirnim simbolima dobivene sa starijim stanicama (veliki broj prolaza) koje su morale biti zamijenjene novim staničnim materijalom, krivulje s masno otisnutim simbolima prikazuju stanice s dopuštenom tolerancijom izlaganja zračenju.

Iz tih podataka izvedena je najveća necitotoksična doza zračenja od 5 J/cm^2 (vertikalna isprekidana crta). Horizontalna isprekidana crta prikazuje još i maksimalno prihvatljiv učinak zračenja naveden u stavku 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA**

UVOD

1. Smjernice OECD-a za ispitivanje kemijskih tvari i ispitne metode EU-a koje se na njima temelje, periodički se preispituju u svjetlu znanstvenog napretka, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. Originalna ispitna metoda (TM) za utvrđivanje preosjetljivosti kože kod miševa, analiza lokalnih limfnih čvorova (LLNA; Smjernica za ispitivanje OECD-a 429; Poglavlje B.42 ovog Priloga) je prethodno donesena (1). Objavljeni su detalji validacije metode LLNA i pregled povezanog djelovanja (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Ažurirana metoda LLNA se temelji na ocjeni iskustva i znanstvenih podataka (12). To je druga ispitna metoda za procjenu potencijala kemikalija da senzibiliziraju kožu kod životinja (tvari i smjese). U drugoj metodi (Smjernica za ispitivanje OECD-a 406; Poglavlje B.6. ovog Priloga) primjenjuju se testovi na zamorcima, konkretnije maksimizacijski test sa zamorcima i Buehlerov test (13). Metoda LLNA ima određene prednosti u odnosu na B.6 i Smjernicu za ispitivanje OECD-a 406 (13) s obzirom na dobrobit životinja. Ova ažurirana ispitna metoda LLNA obuhvaća niz referentnih normi (Dodatak 1.) koje se mogu koristiti za ocjenjivanje statusa validacije novih i/ili izmijenjenih ispitnih metoda koje su u funkcionalnom i mehanicističkom smislu slične metodi LLNA u skladu s načelima iz Smjernice OECD-a br. 34 (14).

2. Metodom LLNA proučava se indukcijska faza senzibilizacije kože i dobivaju kvantitativni podaci pogodni za procjenjivanje reakcije na dozu. Treba napomenuti da su blagi/umjereni senzibilizatori, koji se preporučuju kao prikladne pozitivne kontrolne tvari za test sa zamorcima (B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13), prikladni i za uporabu kod metode LLNA (6)(8)(15). Kao opcija ove ispitne metode također je opisan smanjeni pristup LLNA (rLLNA) pri kojem bi se moglo koristiti do 40 % manje životinja. Metoda rLLNA se može koristiti kada postoji regulatorna potreba za potvrđivanjem negativnog predviđanja potencijala preosjetljivosti kože pod uvjetom da su ispunjene sve ostale specifikacije protokola LLNA, kako je opisano u ovoj metodi. Predviđanje negativnog rezultata treba se temeljiti na svim dostupnim informacijama opisanim u stavku 4. Prije primjene pristupa rLLNA potrebno je dostaviti jasna obrazloženja i znanstvenu utemeljenost njegove uporabe. Ako se unatoč očekivanjima dobiju pozitivan ili dvosmislen rezultat rLLNA, mogu biti potrebna dodatna ispitivanja radi tumačenja ili razjašnjenja nalaza. Metoda rLLNA se ne smije koristiti za utvrđivanje opasnosti ispitivanih tvari koje uzrokuju preosjetljivost kože ako su potrebni podaci o reakciji na dozu, kao što je potkategorizacija za Uredbu (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa i Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN).

DEFINICIJE

3. Korištene definicije navedene su u Dodatku 2.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Metoda LLNA alternativna je metoda za utvrđivanje kemikalija koje imaju potencijal za uzrokovanje senzibilizacije kože. To nužno ne znači da u svim slučajevima metodu LLNA treba primijeniti umjesto testa sa zamorcima (B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13), već da je pokus jednakovrijedan i da se može koristiti kao alternativa kod koje za pozitivne i negativne rezultate obično nije potrebna daljnja potvrda. Ispitni laboratoriji trebaju uzeti u obzir sve dostupne podatke o ispitivanoj tvari prije provođenja studije. Spomenuti podaci uključuju identitet i kemijsku strukturu

▼M3

ispitivane tvari, njezina fizikalno-kemijska svojstva, rezultate svih *in vitro* ili *in vivo* ispitivanja toksičnosti i toksikološke podatke o strukturno povezanim kemikalijama. Ti se podaci uzimaju u obzir radi utvrđivanja prikladnosti metode LLNA za odnosnu tvar (s obzirom na nekompatibilnost određenih vrsta kemikalija s metodom LLNA - vidjeti stavak 5.) i pomoći kod odabira doze.

5. Metoda LLNA je metoda *in vivo*, pa kao takva ne isključuje uporabu životinja u procjeni kontaktne senzibilizacijske aktivnosti. Međutim, ona ima potencijala smanjiti broj životinja koje su potrebne za tu svrhu. Nadalje, metoda LLNA nudi znatno finiji način uporabe životinja (manje boli i patnje) u ispitivanju kontaktne senzibilizacije. Metoda LLNA temelji se na analizi imunoloških događanja koja stimuliraju kemikalije za vrijeme indukcijske faze senzibilizacije. Za razliku od testa sa zamorcima (B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13), kod metode LLNA nije potrebno izazivati provokacijski inducirane hipersenzibilizirane dermalne reakcije. Nadalje, za metodu LLNA nije potrebno koristiti adjuvans, kao što je to slučaj s maksimizacijskim testom sa zamorcima (13). Metoda LLNA stoga smanjuje bol i patnju životinja. Unatoč prednostima metode LLNA u odnosu na B.6 i Smjernicu za ispitivanje OECD-a 406, treba priznati da postoje neka ograničenja zbog kojih može biti potrebno primijeniti B.6 ili Smjernicu za ispitivanje OECD-a 406 (13) (npr. lažni negativni nalazi metode LLNA kod određenih metala, lažni pozitivni nalazi kod nekih sredstava s nadražujućim djelovanjem na kožu (kao što su neke površinski aktivne tvari) (19) (20) ili topivost ispitivane tvari). Povrh toga, ispitivanja na zamorcima mogu biti potrebna za kemijske razrede ili tvari koje sadrže funkcionalne skupine za koje je dokazano da djeluju kao potencijalni zbunjujući faktori (21) (npr. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13). Nadalje, s obzirom na ograničenu bazu podataka za validaciju koja se prije svega sastoji od formulacija pesticida, pozitivni rezultat za ove vrste ispitivanih tvari se može vjerojatnije postići metodom LLNA nego ispitivanjem na zamorcima (22). Međutim, kod ispitivanja formulacija mogu se uzeti u obzir slične tvari s poznatim rezultatima kao referentne vrijednosti za dokazivanje ispravnog djelovanja metode LLNA (vidjeti stavak 16.). Pored takvih utvrđenih ograničenja LLNA se može primjenjivati za ispitivanje bilo koje tvari, osim ako ne postoji mogućnost da bi njezina svojstva mogla utjecati na točnost metode LLNA.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Metoda LLNA počiva na temeljnom načelu prema kojem senzibilizatori induciraju primarnu proliferaciju limfocita u limfnom čvoru čime dolazi do drenaže mjesta kemijske primjene. Ta je proliferacija proporcionalna primijenjenoj dozi i potencijalu primijenjenog alergena te predstavlja jednostavan način za dobivanje kvantitativno izmjerene senzibilizacije. Proliferacija se mjeri usporedbom prosječne proliferacije svake ispitivane skupine s prosječnom proliferacijom u kontrolama tretiranim nosačem. Određuje se omjer prosječne proliferacije u svakoj tretiranoj skupini i proliferacije u kontrolama s nosačem, nazvan indeks stimulacije, koji mora biti najmanje tri da bi se ispitivana tvar mogla dalje vrednovati kao potencijalni senzibilizator kože. Ovdje opisane metode temelje se na uporabi *in vivo* radioaktivnih oznaka za mjerenje povećanog broja stanica koje proliferiraju u aurikularnim limfnim čvorovima koji uzrokuju drenažu. Međutim, za procjenu broja proliferirajućih stanica mogu se koristiti drugi parametri ako su u potpunosti ispunjeni zahtjevi izvedbe (Dodatak 1.).

▼M3

OPIS ANALIZE

Odabir životinjskih vrsta

7. Za ovaj su test odabrana vrsta miševi. Koriste se mlade odrasle ženke soja CBA/Ca ili CBA/J koje još nisu imale potomstvo i nisu skotne. Na početku studije životinje trebaju biti stare između osam do 12 tjedana, a odstupanje mase životinja treba biti minimalno i ne smije prelaziti 20 % srednje mase. Drugi sojevi i mužjaci mogu se koristiti ako postoji dovoljno podataka da u reakciji prema metodi LLNA nema razlika specifičnih za soj i/ili spol.

Uvjeti smještaja i prehrane

8. Miševi trebaju biti smješteni u skupinama (23), osim ako se ne dokaže prikladna znanstvena utemeljenost za pojedinačni smještaj. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće.

Priprema životinja

9. Životinje se nasumice biraju, jednoznačno identificiraju (ali ne bilo kojim oblikom označavanja ušiju) i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka doziranja kako bi se aklimatizirale na laboratorijske uvjete. Prije početka tretiranja sve životinje treba pregledati kako bi se potvrdilo da nemaju zapaženih lezija kože.

Priprema ispitnih otopina

10. Tvrde kemikalije se prije primjene na uho miša trebaju rastopiti ili suspendirati u otapalima/nosačima i prema potrebi razrijediti. Tekuće kemikalije se mogu nanijeti čiste ili razrijeđene prije doziranja. Netopive kemikalije, koje se obično koriste u medicinskim uređajima, trebaju se podvrgnuti postupku pretjerane ekstrakcije u odgovarajućem otapalu kako bi se prije primjene na uho miša otkrili svi ekstraktibilni sastojci za ispitivanje. Ispitivane tvari se pripremaju svakodnevno osim ako podaci o stabilnosti ne dokažu prihvatljivost njihova skladištenja.

Provjera pouzdanosti

11. Kemikalije pozitivne kontrole koriste se kako bi se dokazalo da se pokus provodi na odgovarajući način tako što reagiraju prikladnom i ponovljivom preosjetljivošću kao ispitivana tvar koja uzrokuje preosjetljivost, čiji je stupanj reakcije točno utvrđen. Preporučuje se uvođenje paralelne pozitivne kontrole radi dokazivanja sposobnosti laboratorija da uspješno izvede svaku analizu i kako bi se omogućilo ocjenjivanje ponovljivosti i usporedivosti unutar jednog ili između više laboratorija. Određena regulatorna tijela zahtijevaju pozitivnu kontrolu za svaku studiju te se stoga korisnici pozivaju da prije izvođenja metode LLNA kontaktiraju relevantna tijela. Sukladno tomu, potiče se rutinska uporaba paralelne pozitivne kontrole kako bi se izbjeglo dodatno ispitivanje na životinjama radi ispunjavanja zahtjeva koji se mogu javiti zbog periodičke uporabe paralelne kontrole (vidjeti stavak 12.). Pozitivna kontrola treba proizvesti pozitivnu reakciju na metodu LLNA kod

▼M3

razine izlaganja za koju se očekuje da će dati porast indeksa stimulacije (SI) > 3 u odnosu na negativnu kontrolnu skupinu. Dozu pozitivne kontrole treba odabrati tako da ne uzrokuje prekomjerno nadraživanje kože ili sustavnu toksičnost i da je indukcija ponovljiva, ali ne prekomjerna (tj. SI > 20 se smatra pretjeranim). Poželjne pozitivne kontrole su 25 %-tni heksilcinamaldehid (CAS br. 101-86-0) u acetonu: maslinovo ulje (4:1; v/v) i 5 %-tni merkaptobenzotiazol (CAS br. 149-30-4) i N,N-N-dimetilformamid (vidjeti Dodatak 1., Tablicu 1.). Moguće su okolnosti u kojima se, uz odgovarajuće obrazloženje, mogu koristiti druge pozitivne kontrole koje ispunjavaju gore navedene kriterije.

12. Iako se preporučuje uvođenje paralelne skupine pozitivne kontrole, u određenim situacijama periodičko ispitivanje (tj. u intervalima ≤ 6 mjeseci) pozitivne kontrole može biti prikladno za laboratorije koji redovito izvode metode LLNA (tj. najmanje jednom mjesečno) i imaju povijesnu bazu podataka pozitivne kontrole koja dokazuje sposobnost laboratorija da dobiva ponovljive i točne rezultate pozitivnih kontrola. Odgovarajuća osposobljenost za metodu LLNA može se uspješno dokazati dobivanjem dosljednih pozitivnih rezultata pozitivne kontrole u najmanje 10 neovisnih ispitivanja provedenih u razumnom vremenskom razdoblju (manje od jedne godine).

13. Paralelnu skupinu pozitivne kontrole potrebno je uvesti svaki put kada dođe do proceduralne promjene metode LLNA (zamjena stručnog osoblja, promjena materijala i/ili reagensa ispitne metode, promjena opreme, promjena izvora ispitivanih životinja) i te se promjene moraju navesti u laboratorijskim izvješćima. Potrebno je uzeti u obzir učinak tih promjena na primjerenost prethodno uspostavljene baze podataka prilikom utvrđivanja potrebe za uspostavom nove baze povijesnih podataka radi dokazivanja dosljednosti rezultata pozitivne kontrole.

14. Istraživači trebaju biti svjesni da odluka o provođenju periodičke umjesto paralelne studije pozitivne kontrole utječe na prikladnost i prihvatljivost negativnih rezultata dobivenih bez paralelne pozitivne kontrole u razdoblju između svake periodičke pozitivne kontrole. Na primjer, ako se periodičkom pozitivnom kontrolom dobije lažni negativni rezultat, mogu se dovesti u pitanje negativni rezultati ispitivane tvari dobiveni u razdoblju između posljednje prihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije i neprihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije. Kod odlučivanja o uvođenju paralelne pozitivne kontrole ili provođenju samo periodičkih pozitivnih kontrola potrebno je pažljivo uzeti u obzir posljedice tih rezultata. Također je potrebno razmotriti mogućnost uporabe manjeg broja životinja u skupini paralelne pozitivne kontrole ako je to opravdano sa znanstvenog stajališta i ako laboratorij na temelju svojih posebnih povijesnih podataka dokaže da se može koristiti manje miševa (12).

15. Iako pozitivnu kontrolnu tvar treba ispitati u nosaču za koji je poznato da izaziva dosljednu reakciju (npr. aceton; maslinovo ulje; 4:1, v/v), u nekim regulatornim situacijama bit će potrebno i ispitivanje u nestandardnom nosaču (klinički/kemijski relevantnoj formulaciji) (24). Ako se paralelna pozitivna kontrola ispituje u drugačijem nosaču od ispitivane tvari, potrebno je uključiti posebnu kontrolu s nosačem za paralelnu pozitivnu kontrolu.

16. U slučajevima kada se ocjenjuju tvari iz posebnog kemijskog razreda ili raspona reakcija, referentne tvari mogu također biti korisne za dokazivanje ispravnosti ispitne metode za otkrivanje potencijala preosjetljivosti kože tih vrsta ispitivanih tvari. Prikladne referentne tvari moraju imati sljedeće značajke:

— strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom ispitivane tvari,

— poznata fizikalna/kemijska svojstva,

— popratne podatke iz LLNA,

— popratne podatke od drugih životinjskih modela i/ili ljudi.

▼M3

ISPITNI POSTUPAK

Broj životinja i visine doze

17. Po jednoj dozirnoj skupini koriste se najmanje četiri životinje, s najmanje tri koncentracije ispitivane tvari, plus paralelna negativna kontrolna skupina tretirana samo nosačem za ispitivanu tvar i jedna pozitivna kontrola (paralelna ili nedavno provedena, na temelju laboratorijske politike uzimajući u obzir stavke 11.-15.). Potrebno je razmotriti ispitivanje višestrukih doza pozitivne kontrole, posebno ako se ispitivanje pozitivne kontrole izvodi s prekidima. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati i tretirati ih jednako kao i životinje u tretiranim skupinama.

18. Odabir doze i nosača treba se temeljiti na preporukama navedenim u referencama (3) i (5). Uzastopne doze se obično odabiru iz odgovarajućih serija koncentracija kao što su 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Odabir uporabljene serije koncentracija mora biti popraćena odgovarajućim znanstvenim obrazloženjem. Kod odabira tri uzastopne koncentracije treba uzeti u obzir sve postojeće toksikološke podatke (o akutnoj toksičnosti i nadraživanju kože) te strukturne i fizikalno-kemijske podatke, ako dostupne, kako bi se najvišom koncentracijom maksimaliziralo izlaganje, ali istodobno izbjegla sustavna toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (3)(25). U nedostatku tih podataka može biti potrebno provesti početno predprobiranje (vidjeti stavke 21.-24.).

19. Nosač ne smije ometati niti utjecati na rezultate ispitivanja i treba se odabrati na temelju povećanja topljivosti s ciljem postizanja što viših koncentracija, a da se istodobno proizvede otopina/suspenzija pogodna za primjenu ispitivane tvari. Kao nosači preporučuju se aceton: maslinovo ulje (4:1 v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol i dimetil sulfoksid (19), ali mogu se koristiti i drugi ako se to dostatno znanstveno obrazloži. U nekim situacijama može biti potrebno primijeniti klinički relevantno otapalo ili komercijalnu formulaciju u kojoj se ispitivana tvar prodaje, kao dodatnu kontrolu. Posebno treba paziti da u sustav nosača budu ugrađene hidrofilne ispitivane tvari koje vlaže kožu i ne isušuju se odmah, uključivanjem odgovarajućih sredstava za otapanje (npr. 1 %-tnim Pluronic® L92). Znači, nosače koji su u potpunosti vodeni treba izbjegavati.

20. Obrada limfnih čvorova pojedinačnih miševa omogućuje ocjenjivanje promjenljivosti među životinjama i statističku usporedbu razlika između mjerenja ispitivanom tvari i kontrolnom skupinom s nosačem (vidjeti stavak 35.). Pored toga, ocjenjivanje mogućnosti smanjenja broja miševa u skupini pozitivne kontrole je izvedivo nakon što se prikupe pojedinačni podaci o životinjama (12). Određena regulatorna tijela zahtijevaju da se prikupe pojedinačni podaci o životinjama. Međutim, neka regulatorna tijela mogu prihvatiti skupne podatke o životinjama i u tim slučajevima korisnici mogu sami odabrati hoće li prikupljati pojedinačne ili skupne podatke o životinjama.

Predprobiranje

21. Ako nisu dostupne informacije za određivanje najviše doze za ispitivanje (vidjeti stavak 18.), potrebno je obaviti predprobiranje kako bi se odredila odgovarajuća visina doze za ispitivanje u LLNA. Svrha predprobiranja je pružiti smjernice za odabir najviše doze za uporabu u glavnoj studiji LLNA ako nisu dostupne informacije o koncentraciji koja uzrokuje sustavnu toksičnost (vidjeti stavak 24.) i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (vidjeti stavak 23.). Najveća ispitana visina doze je 100 %-tna ispitivana tvar za tekućine ili najveća moguća koncentracija za krute tvari ili suspenzije.

▼M3

22. Predprobiranje se izvodi u uvjetima koji su identični glavnoj studiji LLNA, s razlikom da se ne ocjenjuje proliferacija limfnih čvorova i može se koristiti manje životinja po dozirnoj skupini. Preporučuje se uporaba jedne ili dvije životinje po dozirnoj skupini. Svi miševi se svakodnevno prate s ciljem otkrivanja kliničkih znakova sustavne toksičnosti ili lokalnog nadraživanja na mjestu primjene. Tjelesna masa se bilježi prije ispitivanja i prije završetka (6. dan). Oba uha svakog miša se pregledavaju radi otkrivanja eritema i boduju se prema tablici 1. (25). Debljina uha se mjeri posebnim mjernim instrumentom (pr. digitalnim mikrometrom ili mjeračem debljine Peacock Dial) prvi dan (prije doze), treći dan (otprilike 48 sati nakon prve doze) i šesti dan. Pored toga, šesti dan se debljina uha može odrediti mjerenjem mase uzorka uha dobivenog probijanjem, što se izvodi nakon humanog usmrćenja. Prekomjerno lokalno nadraživanje kože se označuje bodovima za eriteme ≥ 3 i/ili povećanjem debljine uha za ≥ 25 % na bilo koji dan mjerenja (26) (27). Najviša odabrana doza za glavnu studiju LLNA je sljedeća niža doza iz serije koncentracija u predprobiranju (vidjeti stavak 18.) koja ne uzrokuje sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože.

Tablica 1.

Bodovanje eritema

Zapažanja	Bodovi
Bez eritema	0
Vrlo slabi eritem (jedva zamjetan)	1
Dobro vidljiv eritem	2
Umjeren do jak eritem	3
Jak eritem (crvenilo cikle) do nekroze kože što onemogućuje stupnjevanje eritema	4

23. Pored 25 %-tnog povećanja debljine uha (26) (27), statistički značajno povećanje debljine uha kod tretiranih miševa u odnosu na kontrolne miševe se također koristi za određivanje nadražujućih tvari u LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Međutim, iako se statistički značajna povećanja debljine uha mogu javiti, kada su ona manja od 25 % ne povezuju se posebno s prekomjernim nadraživanjem (30) (32) (33) (34).

24. Kada se koriste u okviru cjelokupne ocjene, sljedeća klinička opažanja mogu ukazivati na sustavnu toksičnost (35) (36) te stoga mogu naznačiti najvišu dozu za uporabu u glavnoj LLNA: promjene u djelovanju živčanog sustava (npr. piloerekcija, ataksija, tremori i grčevi); promjene u ponašanju (npr. agresivnost, promjene u njezi, značajna promjena u stupnju aktivnosti); promjene u disanju (npr. promjene učestalosti i intenziteta disanja kao što su dispneja, zadihanost i hroptanje) i promjene u konzumaciji hrane i vode. Prilikom ocjenjivanja treba uzeti u obzir znakove letargije i/ili nereagiranja, sve kliničke znakove boli i patnje koji nisu blagi ili trenutačni, ili gubitak težine > 5 % od prvog do šestog dana i smrtnost. Životinje koje su pred uginućem ili koje očito trpe bol ili pokazuju znakove teške i trajne patnje trebaju se humano usmrtiti (37).

▼M3

Plan pokusa glavne studije

25. Plan pokusa je sljedeći:

— *Prvi dan:* Pojedinačno identificirati životinje i zabilježiti masu svake životinje i sva klinička opažanja. Primijeniti 25 µl odgovarajuće otopine ispitivane tvari, samog nosača ili pozitivne kontrole (paralelna ili nedavno provedena, na temelju laboratorijske politike uzimajući u obzir stavke 11.-15.) na stražnji dio uha.

— *Drugi i treći dan:* Ponoviti postupak primjene proveden prvog dana.

— *Četvrti i peti dan:* Bez tretiranja.

— *Šesti dan:* Zabilježiti masu svake životinje. Svim miševima u ispitnoj i kontrolnoj skupini u venu na repu ubrizgati 250 µl sterilnog fosfatnog pufera (PBS) sa sadržajem 20 µCi ($7{,}4e + 10^5$ Bq)^{3}H-metil timidina. Alternativno svim miševima u venu na repu ubrizgati 250 µl sterilnog fosfatnog pufera (PBS) sa sadržajem 2 µCi ($7{,}4e + 10^4$ Bq)^{125}I-jododeoksiuridina i 10^{-5} M fluorodeoksiuridina. Nakon pet sati životinje humano usmrtiti. Izrezati drenažne aurikularne limfne čvorove iz svakog uha i staviti zajedno u pufer PBS za svaku životinju (pojedinačni pristup); alternativno uzeti limfne čvorove iz svakog uha i staviti u pufer PBS za svaku tretiranu skupinu (skupni pristup). Pojedinosti i sheme za identifikaciju i disekciju limfnih čvorova mogu se naći u referenci (12). Za daljnje praćenje lokalne reakcije kože u glavnoj studiji mogu se u protokol studije uključiti dodatni parametri kao što su ocjenjivanje eritema ušiju ili mjerenja debljine uha (dobiveni uređajem za mjerenje debljine ili određivanjem mase uzorka uha pri obdukciji).

Priprema suspenzije stanica

26. Suspenzija pojedinačnih stanica limfnih čvorova (LNC), odstranjenih bilateralno iz pojedinačnih životinja ili iz tretiranih skupina, priprema se nježnom mehaničkom dezagregacijom kroz mrežicu od 200 µm od nehrđajućeg čelika ili drugom prihvatljivom metodom za dobivanje suspenzije pojedinačnih stanica. Stanice limfnog čvora dva se puta peru preostalim puferom PBS i DNA se ostave 18 sati taložiti s 5 % trikloroctenom kiselinom (TCA) pri 4 °C (3). Peleti se ponovno suspendiraju u 1 ml TCA i prenose u scintilacijske bočice koje sadrže 10 ml scintilacijske tekućine za brojanje^{3}H, ili se prenose izravno u kušalice za brojanje joda^{125}I pomoću gama zraka.

Određivanje proliferacije stanica (ugrađena radioaktivnost)

27. Ugradnja^{3}H-metil timidina mjeri se β-scintilacijskim brojačem kao raspadanje u minuti (DPM). Ugradnja^{125}I-jododeoksiuridina mjeri se brojanjem joda^{125}I i također se izražava kao DPM. Ovisno o pristupu, ugradnja će se izražavati kao DPM/miš (individualni pristup) ili DPM/tretirana skupina (skupni pristup).

Smanjena LLNA

28. U određenim slučajevima kada postoji regulatorna potreba za potvrđivanjem negativnog predviđanja potencijala preosjetljivosti kože, može se koristiti neobavezni protokol rLLNA (16) (17) (18) s manjim brojem životinja, pod uvjetom da su ispunjene sve ostale specifikacije protokola LLNA iz ove ispitne metode. Prije primjene pristupa rLLNA potrebno je dostaviti jasna obrazloženja i znanstvenu utemeljenost njegove uporabe. Ako se dobije pozitivan ili dvosmislen rezultat, mogu biti potrebna dodatna ispitivanja radi tumačenja ili razjašnjenja nalaza.

▼M3

29. Jedina razlika između protokola ispitnih metoda LLNA i rLLNA je manji broj dozirnih skupina zbog čega rLLNA ne daje podatke o odnosu doza-učinak. Metoda rLLNA se stoga ne treba koristiti kada su potrebni podaci o odnosu doza-učinak. Kao i kod LLNA s više doza, koncentracija ispitivane tvari koja se ocjenjuje u rLLNA mora biti najveća koncentracija koja ne uzrokuje očitu sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože kod miševa (vidjeti stavak 18.).

OPAŽANJA

Klinička opažanja

30. Sve miševe treba pomno opažati najmanje jednom dnevno s obzirom na sve kliničke znakove lokalnog nadraživanja na mjestu primjene ili sustavne toksičnosti. Sva opažanja sustavno se bilježe te se za svaku životinju bilješke vode pojedinačno. Programi praćenja uključuju kriterije za pravodobno identificiranje miševa koji pokazuju znakove sustavne toksičnosti, prekomjernog lokalnog nadraživanja kože ili korozije kože za eutanaziju (37).

Tjelesne mase

31. Kao što je navedeno u stavku 25., pojedinačne tjelesne mase treba mjeriti na početku testa i u vrijeme planiranog usmrćivanja životinja.

IZRAČUN REZULTATA

32. Rezultati za svaku tretiranu skupinu izraženi su kao indeks stimulacije (SI). Ako se primjenjuje individualni pristup, SI se dobiva dijeljenjem prosječnog raspadanja u minuti (DPM) po životinji unutar svake skupine tretirane ispitivanom tvari i pozitivne kontrolne skupine s prosječnim DPM po životinji za kontrolnu skupinu s otopinom/nosačem. Prosječan SI za kontrolne skupine tretirane nosačem tada iznosi 1. Ako se primjenjuje skupni pristup, SI se dobiva tako da se za svaku tretiranu skupinu skupno ugrađena radioaktivnost podijeli sa skupnom ugradnjom kontrolne skupine za otapalo; tako se dobiva prosječni indeks SI.

33. U postupku odlučivanja rezultat se smatra pozitivnim kada je SI $\geq$ 3. Međutim, kod odlučivanja da se neki granični rezultat proglasi pozitivnim može se, također, koristiti snaga učinka na dozu, statistički značaj i dosljednost reakcija u otapalu/nosaču i pozitivnoj kontroli (4) (5) (6).

34. Ako je potrebno razjasniti dobivene rezultate, valja uzeti u obzir razna svojstva ispitivane tvari, uključujući i to ima li strukturne veze s poznatim senzibilizatorima kože, uzrokuje li pretjerano nadraživanje kože kod miševa i prirodu odnosa opažene reakcije na dozu. Ova i druga pitanja detaljno su razmotrena drugdje (7).

35. Prikupljanje podataka o radioaktivnosti na razini pojedinačnog miša omogućit će statističku analizu prisutnosti i stupnja odnosa između doze i učinka. Svaka statistička procjena može uključiti ocjenu odnosa između doze i učinka te odgovarajući prilagođene usporedbe ispitnih skupina (npr. skupina s doziranjem u parovima u odnosu na paralelne kontrolne skupine s nosačem). Statističke analize mogu uključiti linearnu regresiju ili Williamsov test za ocjenu trendova odnosa doza-učinak i Dunnettov test za usporedbe u parovima. Prilikom odabira prikladne metode statističke analize istraživač treba biti svjestan eventualnih razlika između varijanata kao i drugih problema s tim u vezi, zbog kojih može biti neophodna transformacija podataka ili neparametarska statistička analiza. U svakom slučaju istraživač će možda morati izvršiti izračune SI i statističke analize sa sigurnim točkama podataka (koji se ponekad nazivaju „netipične vrijednosti”) i bez njih.

▼M3

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

36. Podatke treba sažeti u tabličnom obliku. Kad se koristi pristup pojedinačne životinje, navode se vrijednosti DPM za pojedinačnu životinju, srednje vrijednosti DPM za skupinu/životinja, s tim povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) i srednja vrijednost SI za svaku dozirnu skupinu u odnosu na paralelnu kontrolnu skupinu s nosačem. Kad se koristi skupni pristup za tretiranu skupinu, navode se srednje/prosječne vrijednosti DPM i srednja vrijednost SI za svaku dozirnu skupinu u odnosu na paralelnu kontrolnu skupinu s nosačem.

Izvješće o ispitivanju

37. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane i kontrolne tvari:

— identifikacijski podaci (npr. brojevi CAS i EZ, ako su poznati, podrijetlo, čistoća, poznate nečistoće, broj šarže),

— fizikalna priroda i fizikalno-kemijska svojstva (npr. hlapljivost, stabilnost, topljivost),

— ako je mješavina, sastav i relativni postoci sastojaka.

Otapalo/nosač:

— identifikacijski podaci (čistoća, koncentracija (prema potrebi); upotrijebljeni volumen),

— dokaz opravdanosti izbora nosača.

Ispitne životinje:

— podrijetlo miševa CBA,

— mikrobiološki status životinja, ako je poznat,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o pripravljanju i primjeni ispitivane tvari,

— dokaz opravdanosti odabira doze (uključujući rezultate predprobiranja, ako je provedeno),

— koncentracije nosača i ispitivane tvari koji su upotrijebljeni i ukupna količina tvari koja je primijenjena,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući vrstu/podrijetlo hrane, izvor vode),

— pojedinosti o programima tretiranja i uzorkovanja,

— metode mjerenja toksičnosti,

— kriteriji za određivanje studija pozitivnima ili negativnima,

— pojedinosti o bilo kojim odstupanjima od protokola i objašnjenje učinaka tog odstupanja na izradu i rezultate studije,

Provjera pouzdanosti:

— sažetak rezultata najsvježije provjere pouzdanosti uključujući informacije o upotrijebljenoj ispitanoj tvari, koncentraciji i nosaču,

— podaci o paralelnim i/ili povijesnim pozitivnim kontrolama i paralelnim negativnim kontrolama za ispitni laboratorij,

▼M3

— ako nije uključena paralelna pozitivna kontrola, datum i laboratorijsko izvješće za posljednju periodičku pozitivnu kontrolu i izvješće u kojem se navode povijesni pozitivni kontrolni podaci za laboratorij, kojima se opravdava neprovođenje paralelne pozitivne kontrole,

Rezultati:

— pojedinačne mase miševa na početku doziranja i u vrijeme planiranog usmrćenja, srednja i s tim povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za svaku tretiranu skupinu,

— vrijeme prve pojave i znakova toksičnosti, uključujući eventualno nadraživanje kože na mjestu primjene, za svaku životinju

— tablica DPM vrijednosti za pojedinačne miševe (individualni pristup) ili srednjih/prosječnih (skupni pristup za tretiranu skupinu) DPM vrijednosti i indeksi stimulacije za svaku tretiranu skupinu,

— srednja i povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za DPM/miš za svaku tretiranu skupinu i rezultati analize netipičnih vrijednosti za svaku tretiranu skupinu ako se koristi pojedinačni pristup,

— izračunani SI i prikladno mjerilo promjenljivosti koje uzima u obzir promjenljivost između životinja u ispitivanoj tvari i kontrolnim skupinama kada se koristi pojedinačni pristup,

— odnos doza – reakcija,

— statistička analiza, ako je primjereno,

Rasprava o rezultatima:

— kratki komentar o rezultatima, analiza doza-reakcije i, prema potrebi, statističke analize, sa zaključkom o tome treba li ispitivanu tvar smatrati senzibilizatorom kože.

REFERENCE

1. OECD (2002.), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992.), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, str. 165-169.

3. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994.), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, str. 13-31.

4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998.), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, str. 563-79.

5. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996.), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, str. 999-1002.

6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996.), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, str. 985-997.

7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998.), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, str. 327-33.

▼M3

8. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000.), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, str. 49-59.

9. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: str. 258-273.

10. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, str. 274-286.

11. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: str. 249-257.

12. ICCVAM (2009.), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

13. OECD (1992.), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

14. OECD (2005.), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

15. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998.), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, str. 281-284.

16. Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006.), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, str. 181-185.

17. ESAC (2007.), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate-General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Dostupno na: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

18. ICCVAM (2009.), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

19. ICCVAM (1999.), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

20. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008.), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, str. 1896-1904.

21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009.), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, str. 90-96.

22. ICCVAM (2009.), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

23. ILAR (1996.), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

24. McGarry, H.F. (2007.), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, str. 71-89.

25. OECD (2002.), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 404, Pariz, France. Dostupno na: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007.), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, str. 235.

27. ICCVAM (2009.), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998.), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, str. 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998.), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, str. 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998.), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, str. 245-256.

31. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999.), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, str. 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005.), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, str. 60-68.

33. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005.), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, str. 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007.), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, str. 1023-1028.

35. OECD (1987.), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Pariz, France. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

36. ICCVAM (2009.), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

37. OECD (2000.), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Dodatak 1.

Zahtjevi izvedbe za ocjenjivanje predloženih sličnih ili izmijenjenih ispitnih metoda llna za preosjetljivost kože

UVOD

1. Cilj zahtjeva izvedbe je pružiti temelj na kojem se za nove ispitne metode, zaštićene (autorskim pravima, žigom, registrirane) i nezaštićene, može odrediti njihova dostatna točnost i pouzdanost za posebne svrhe ispitivanja. Ti zahtjevi izvedbe koji se temelje na validiranim i prihvaćenim ispitnim metodama, mogu se koristiti za ocjenjivanje pouzdanosti i točnosti drugih sličnih metoda (kolokvijalno nazvanih „i ja također" testovi) koje se temelje na sličnim znanstvenim načelima i mjere ili predviđaju isti biološki ili toksični učinak (14).

2. Prije donošenja izmijenjenih metoda (tj. predloženih mogućih poboljšanja odobrene ispitne metode) potrebno je ocijeniti učinak predloženih izmjena na rezultat ispitivanja i mjeru u kojoj će te izmjene utjecati na dostupne podatke o ostalim sastavnicama validacijskog postupka. Ovisno o broju i vrsti predloženih izmjena, dobivenim podacima i pripadajućoj dokumentaciji o tim izmjenama, one trebaju proći isti validacijski postupak kako je opisan za novo ispitivanje ili, ako je prikladno, trebaju biti predmet ograničenog ocjenjivanja pouzdanosti i važnosti na temelju utvrđenih zahtjeva izvedbe (14).

3. Za slične ili izmijenjene metode, koje su predložene za uporabu u okviru ove ispitne metode, treba se odrediti njihova pouzdanost i točnost koristeći kemikalije koje predstavljaju puni raspon bodova LLNA. Kako bi se izbjegla neopravdana uporaba životinja, čvrsto se preporučuje da prije započinjanja validacijskih studija u skladu sa zahtjevima izvedbe i smjernicama iz ove ispitne metode kreatori modela konzultiraju odgovarajuća tijela.

4. Ti se zahtjevi izvedbe temelje na usklađenim zahtjevima izvedbe US-ICCVAM, EC-ECVAM i japanskim JaCVAM (12) za ocjenjivanje valjanosti sličnih ili izmijenjenih verzija LLNA. Zahtjevi izvedbe sadrže ključne elemente ispitne metode, preporučene referentne kemikalije i standarde za točnost i pouzdanost koje predložena metoda mora ispuniti ili premašiti.

I. **Ključni elementi ispitne metode**

5. Kako bi se osiguralo da je slična ili izmijenjena metoda LLNA funkcionalno i mehanicistički analogna LLNA i da mjeri isti biološki učinak, u protokol ispitne metode moraju se uključiti sljedeći elementi:

— ispitivana tvar se primjenjuje lokalno na oba uha miša,

— proliferacija limfocita se mjeri u limfnim čvorovima koji dreniraju područje primjene ispitivane tvari,

— proliferacija limfocita se mjeri tijekom indukcijske faze senzibilizacije kože,

▼M3

— najviša odabrana doza za ispitivane tvari je najveća koncentracija koja ne uzrokuje sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože kod miša. Za pozitivne referentne kemikalije najviša doza treba biti visoka barem kao vrijednosti LLNA EC3 za odgovarajuće referentne kemikalije (vidjeti tablicu 1.) i ne smije uzrokovati sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože kod miša,

— u svaku studiju treba uključiti paralelnu kontrolu s nosačem i prema potrebi se također koristi paralelna pozitivna kontrola,

— koriste se najmanje četiri životinje po dozirnoj skupini,

— mogu se prikupljati pojedinačni ili skupni podaci o životinjama.

Ako neki od ovih kriterija nije ispunjen, tada se ovi zahtjevi izvedbe ne mogu koristiti za validaciju slične ili izmijenjene metode.

II. **Minimalni popis referentnih kemikalija**

6. Usklađeni zahtjevi izvedbe US-ICCVAM, EC-ECVAM i japanski –JaCVAM (12) odredili su 18 minimalnih referentnih kemikalija koje se mogu koristiti i četiri neobavezne referentne kemikalije (tj. tvari koje su proizvele lažne pozitivne ili lažne negativne rezultate u LLNA u usporedbi s rezultatima na ljudima i zamorcima (B.6, ili Smjernica OECD-a 406) (13), te stoga omogućuju dokazivanje jednake ili bolje izvedbe u odnosu na LLNA) koje su uključene u zahtjeve izvedbe LLNA. Kriteriji odabira za određivanje tih kemikalija su bili sljedeći:

— popis referentnih kemikalija sadržava one vrste tvari koje se obično testiraju radi njihova potencijala za senzibilizaciju kože i opseg reakcija koje je LLNA u mogućnosti izmjeriti ili predvidjeti,

— tvari imaju jasno definiranu kemijsku strukturu,

— za svaku tvar su dostupni podaci o LLNA iz pokusa na zamorcima (tj. B.6; Smjernica OECD-a 406) (13) i, ako je moguće, podaci iz pokusa na ljudima, i

— tvari su lako dostupne na tržištu.

Preporučene referentne kemikalije su navedene u tablici 1. Studije koje koriste predložene referentne kemikalije ocjenjuju se u nosaču uz koji su navedene u tablici 1. U slučajevima kada navedena tvar nije dostupna, mogu se koristiti druge tvari koje ispunjavaju spomenute kriterije odabira uz odgovarajuće obrazloženje.

▼M3

Tablica 1.

Preporučene referentne kemikalije za zahtjeve izvedbe LLNA

Broj	Kemikalije ([1])	broj CAS	Stanje	Nosač ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x CE3	Stvarni raspon EC3	LLNA u usporedbi sa zamorcima	LLNA u usporedbi s ljudima
1	5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	tekuće	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	kruto	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4- fenilenediamin	106-50-3	kruto	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	kobaltov klorid	7646-79-9	kruto	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	izoeugenol	97-54-1	tekuće	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2- merkaptobenzotiazol	149-30-4	kruto	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	tekuće	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	tekuće	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	eugenol	97-53-0	tekuće	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	fenil benzoat	93-99-2	kruto	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	cimetov alkohol	104-54-1	kruto	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil uree	39236-46-9	kruto	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	metil metakrilat	80-62-6	tekuće	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	klorobenzen	108-90-7	tekuće	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	izopropanol	67-63-0	tekuće	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Broj	Kemikalije ([1])	broj CAS	Stanje	Nosač ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x CE3	Stvarni raspon EC3	LLNA u usporedbi sa zamorcima	LLNA u usporedbi s ljudima
16	mliječna kiselina	50-21-5	tekuće	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	metil salicilat	119-36-8	tekuće	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	salicilna kiselina	69-72-7	kruto	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Neobavezne tvari za dokazivanje poboljšane izvedbe u odnosu na LLNA										
19	natrijev laurilsulfat	151-21-3	kruto	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	etilen glikol dimetakrilat	97-90-5	tekuće	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	ksilen	1330-20-7	tekuće	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	niklov klorid	7718-54-9	kruto	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Skraćenice: AOO = aceton: maslinovo ulje (4:1, v/v); CAS br. = Broj iz međunarodnog popisa kemijskih tvari; DMF = N,N-dimetilformamid; DMSO = dimetil sulfoksid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenzen; EC3 = potrebna procijenjena koncentracija za proizvodnju indeksa stimulacije 3; GP = rezultati testova na zamorcima (tj. B.6 ili Smjernica OECD-a 406) (13); HCA = heksil cimetov aldehid; Liq = tekuće; LLNA = rezultat lokalne analize limfnih čvorova kod miševa tj. B.42 ili Smjernica OECD-a 429) (1); MEK = metil etil keton; NA = nije primjenjivo budući da je indeks stimulacije < 3; NC = nije izračunano budući da su podaci dobiveni iz jedne studije; Sol = kruto; Veh = nosač.

(*) Pretpostavlja se da nije senzibilizator kod ljudi budući da nisu nađeni nikakvi rezultati kliničkih epikutalnih testova, nije uključen u komplet za epikutalno testiranje kao alergen i nisu pronađena nikakva izvješća o slučajevima senzibilizacije kod ljudi.

(**) Podaci o zamorcima nisu dostupni.

([1]) Kemikalije treba pripravljati svakodnevno, osim ako podaci o stabilnosti dokažu da je skladištenje prihvatljivo.

([2]) Zbog mogućeg učinka različitih nosača na učinkovitost LLNA, za svaku referentnu kemikaliju treba koristiti preporučeni nosač (24) (32).

([3]) Prosječna vrijednost ako je dostupno više od jedne vrijednosti EC3. Za negativne tvari (tj. sa stimulacijskim indeksom < 3) navodi se najviša ispitana koncentracija.

([4]) Broj studija LLNA iz kojih su dobiveni podaci.

([5]) Na tržištu je dostupan pod nazivom Kathon CG (br. CAS 55965-84-9), koji je smjesa CMI i MI u odnosu 3:1. Relativne koncentracije svakog sastojka su od 1,1 % do 1,25 % (CMI) i od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivni sastojci su magnezijeve soli (21,5 % do 24 %) i bakrov nitrat (0,15 % do 0,17 %), s preostalom formulacijom 74 % do 77 % vode. Kathon CG je lako dostupan preko Sigma-Aldrich i Rohm and Haas (sada Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Utvrđeni standardi pouzdanosti i točnosti**

7. Točnost slične ili izmijenjene metode LLNA treba ispuniti ili premašiti zahtjeve izvedbe LLNA kada se ocjenjuje uporabom 18 minimalnih referentnih kemikalija koje su obavezne. Nova ili izmijenjena metoda mora se pravilno razvrstati na temelju odluke „da/ne”. Međutim, nova ili izmijenjena metoda možda neće pravilno razvrstati sve minimalne referentne kemikalije koje se trebaju koristiti. Ako je, na primjer, neki blagi senzibilizator pogrešno razvrstan, za dokazivanje jednake učinkovitosti može se uzeti u obzir obrazloženje takve pogreške i prikladni dodatni podaci (rezultati ispitivanja koji pokazuju pravilno razvrstavanje za ostale tvari s fizikalnim, kemijskim i senzibilizacijskim svojstvima sličnim onima pogrešno razvrstane referentne kemikalije). U tim okolnostima validacijski status nove ili izmijenjene ispitne metode LLNA se ocjenjuje pojedinačno za svaki slučaj.

Ponovljivost u laboratoriju

8. Za utvrđivanje ponovljivosti u laboratoriju nova ili izmijenjena metoda LLNA se ocjenjuje uporabom jasno definirane tvari koja uzrokuje preosjetljivost. Zahtjevi izvedbe LLNA temelje se na promjenljivosti rezultata iz ponovljenih testova s heksil cimetovim aldehidom (HCA). Za ocjenjivanje pouzdanosti u laboratoriju potrebno je u četiri zasebne prilike s razmakom od najmanje tjedan dana između testova dobiti granične vrijednosti ocijenjene koncentracije (ECt) za HCA. Za prihvatljivu ponovljivost u laboratoriju svaki laboratorij mora dobiti vrijednosti ECt od 5 % do 20 % za HCA i od 0,025 % do 0,1 % za DNCB, što predstavlja raspon od 0,5 do 2,0-puta prosječne koncentracije EC3, određene za HCA (10 %) u LLNA (vidjeti tablicu 1.).

Ponovljivost između laboratorija

9. Međulaboratorijska ponovljivost nove ili izmijenjene metode LLNA ocjenjuje se uporabom dviju jasno definiranih tvari koje uzrokuju preosjetljivost. Zahtjevi izvedbe LLNA temelje se na promjenljivosti rezultata iz testova s HCA i 2,4-dinitroklorobenzenom (DNCB) u različitim laboratorijima. ECt vrijednosti se dobivaju neovisno i u samo jednoj studiji koja se provodi u najmanje tri zasebna laboratorija. Za dokazivanje prihvatljive ponovljivosti između laboratorija svaki laboratorij mora dobiti vrijednosti ECt od 5 % do 20 % za HCA i od 0,025 % do 0,1 % za DNCB, što predstavlja raspon od 0,5 do 2,0-puta prosječne koncentracije EC3, određene za HCA (10 %) i DNCB (0,05 %), u LLNA (vidjeti tablicu 1.).

▼M3

Dodatak 2.

Definicije

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Ovaj se termin često koristi umjesto „podudarnosti” kako bi se označio udio točnih rezultata ispitne metode (14).

Referentna tvar: tvar koja uzrokuje ili ne uzrokuje preosjetljivost i koja se koristi kao standard za usporedbu s ispitivanom tvari. Referentna tvar treba imati sljedeća svojstva: i. dosljedni i pouzdani izvor(i); ii. strukturna i funkcionalna sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznate fizikalno-kemijske značajke; iv. popratni podaci o poznatim učincima; i v. poznata učinkovitost u okviru željene reakcije.

Ocijenjeni prag koncentracije (ECt): ocijenjena koncentracija ispitivane tvari potrebna da se proizvede indeks stimulacije koji ukazuje na pozitivnu reakciju.

Ocijenjena koncentracija tri (EC3): ocijenjena koncentracija ispitivane tvari potrebna da se proizvede indeks stimulacije tri.

Lažno negativna tvar: ispitivana tvar koja je ispitnom metodom netočno određena kao negativna ili neaktivna kada je u stvari pozitivna ili aktivna.

Lažno pozitivna tvar: ispitivana tvar koja je ispitivanjem netočno određena kao pozitivna ili aktivna kada je u stvari negativna ili neaktivna.

Opasnost: potencijal štetnog učinka na zdravlje ili okoliš. Štetni učinak se javlja samo ako je stupanj izloženosti dovoljno visok.

Ponovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji koji koriste isti protokol i ispituju istu tvar, mogu proizvesti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate. Ponovljivost između laboratorija se određuje prije i tijekom validacijskog postupka i pokazuje u kojoj se mjeri neko ispitivanje može uspješno prenijeti iz jednog laboratorija u drugi, također navedena kao međulaboratorijska ponovljivost (14).

Ponovljivost u laboratoriju: određivanje u kojoj mjeri stručno osoblje u okviru istog laboratorija može uspješno ponoviti rezultate koristeći određeni protokol u različitim trenucima. Također se navodi kao unutarlaboratorijska ponovljivost (14).

I ja također test: kolokvijalni izraz za ispitnu metodu koja je strukturno i funkcionalno slična validiranoj i prihvaćenoj referentnoj ispitnoj metodi. Takva ispitna metoda je kandidat za catch-up validaciju. Izraz se često koristi umjesto slične ispitne metode (14).

Netipična vrijednost: netipična vrijednost je zapažanje koje značajno odstupa od ostalih vrijednosti u nasumičnom uzorku populacije.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode, i iii. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (14).

Zaštićena ispitna metoda: ispitna metoda čija je proizvodnja ili distribucija ograničena patentima, autorskim pravima, žigom itd.

▼**M3**

Osiguranje kvalitete: postupak upravljanja pri kojem pojedinci, neovisni od osoba koje provode ispitivanje, ocjenjuju ispunjavanje standarda laboratorijskog ispitivanja, zahtjeve i postupke vođenja evidencije te točnost prijenosa podataka.

Referentne kemikalije: kemikalije odabrane za uporabu u validacijskom postupku, za koje su reakcije u referentnom sustavu ispitivanja *in vitro* i *in vivo* ili željenim vrstama već poznate. Te kemikalije trebaju biti reprezentativne za razrede kemikalija za koje se očekuje da će ispitna metoda biti uporabljena i trebaju predstavljati puni raspon reakcija koje se mogu očekivati od kemikalija za koje se može koristiti, u rasponu od jake do slabe i negativne reakcije. Za različite faze validacijskog postupka te različite ispitne metode i uporabe mogu biti potrebne različite skupine referentnih kemikalija (14).

Relevantnost: opis odnosa ispitivanja i željenog učinka te njegova značajnost i korisnost za posebnu namjenu. Radi se o mjeri u kojoj ispitivanje točno mjeri ili predviđa željeni biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (sukladnosti) ispitne metode (14).

Pouzdanost: mjera u kojoj se ispitna metoda može ponoviti unutar i između laboratorija tijekom vremena uporabom istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem unutarlaboratorijske i međulaboratorijske ponovljivosti (14).

Preosjetljivost kože: imunološki proces koji se javlja kada je osjetljivi pojedinac lokalno izložen kemijskom alergenu koji uzrokuje imunosnu reakciju kože koja može dovesti do kontaktne preosjetljivosti.

Indeks stimulacije (SI): izračunana vrijednost za ocjenjivanje potencijala preosjetljivosti kože koju može uzrokovati ispitivana tvar, koja je omjer proliferacije u tretiranim skupinama i paralelnoj kontrolnoj skupini s nosačem.

Ispitivana tvar (navodi se također i kao ispitivana kemikalija): svaka tvar ili smjesa koja je ispitana ovom metodom.

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su dovršene validacijske studije radi određivanja relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za posebnu namjenu. Važno je primijetiti da validirana ispitna metoda možda neće biti dovoljno učinkovita u smislu prihvatljive točnosti i pouzdanosti za predloženu namjenu (14).

▼B

B.43. **STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI KOD GLODAVACA**

1. **METODA**

Ova je metoda ekvivalentna metodi iz Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 424 (1997.).

Ova je ispitna metoda razvijena s ciljem dobivanja informacija koje su potrebne kako bi se potvrdila ili detaljnije okarakterizirala potencijalna neurotoksičnost kemikalija kod odraslih životinja. Može se kombinirati s postojećim ispitnim metodama za studije toksičnosti s ponavljanim dozama ili provesti kao zasebna studija. Kod planiranja studija koje se temelje na ovoj metodi preporuča se konzultirati smjernice OECD-a o strategijama i metodama za ispitivanje neurotoksičnosti (1). To je posebno važno ako se razmišlja o modifikacijama preporučenih opažanja i ispitnih postupaka koji se rutinski koriste u ovoj metodi. Smjernice su isto tako korisne za odabir drugih ispitnih postupaka za uporabu u specifičnim okolnostima.

Procjena razvojne neurotoksičnosti nije predmet ove metode.

1.1. UVOD

U procjeni i vrednovanju toksičnih karakteristika kemikalija važno je uzeti u obzir potencijal za izazivanje neurotoksičnih učinaka. Opažanja kojima se provodi probir na potencijalnu neurotoksičnost već su obuhvaćena metodom za ispitivanje sustavne toksičnosti primjenom ponavljanih doza. Ova ispitna metoda može se primijeniti za planiranje studija s ciljem dobivanja dodatnih informacija o neurotoksičnim učincima opaženim u studijama sustavne toksičnosti kod primjene ponavljanih doza, ili za potvrđivanje tih učinaka. Međutim, analizom potencijalne neurotoksičnosti određenih klasa kemikalija može se pretpostaviti da bi se ti učinci mogli primjerenije vrednovati ako se ova metoda primijeni izravno, bez prethodnih pokazatelja potencijalne neurotoksičnosti dobivenih u studijama sustavne neurotoksičnosti s ponavljanom dozom. To je, primjerice, slučaj:

— opažanja neuroloških znakova ili neuropatoloških lezija u toksikološkim studijama koje nisu studije sustavne toksičnosti kod primjene ponavljane doze, ili

— strukturnog odnosa ili drugih informacija koje ih povezuju s poznatim neurotoksičnim tvarima.

Osim toga, može biti i drugih primjera primjerene uporabe ove ispitne metode; za dodatne pojedinosti vidjeti (1).

Ova je metoda razvijena na takav način da se može prilagođavati kako bi zadovoljila posebne potrebe potvrđivanja specifične histopatološke neurotoksičnosti kemikalije i neurotoksičnog učinka kemikalije na ponašanje te kako bi omogućila karakterizaciju i kvantifikaciju neurotoksičnih reakcija.

▼B

Neurotoksičnost su u prošlosti poistovjećivali s neuropatijom, odnosno neuropatološkim lezijama ili neurološkim disfunkcijama, kao što su napadi, paraliza ili tremor. Iako je neuropatija važna manifestacija neurotoksičnosti, danas je jasno da postoji mnogo drugih znakova toksičnosti živčanog sustava (npr. gubitak motorike, smanjene osjetilne funkcije, disfunkcije učenja i pamćenja), koji se ne moraju manifestirati u neuropatološkim i drugim vrstama studija.

Ova metoda ispitivanja neurotoksičnosti razvijena je s ciljem otkrivanja jakih neuropatoloških učinaka i neuroloških učinaka na ponašanje odraslih glodavaca. Dok učinci na ponašanje, čak i kod izostanka morfoloških promjena, mogu biti odraz negativnog učinka na organizam, nisu sve promjene ponašanja vezane isključivo za živčani sustav. Stoga svaku opaženu promjenu treba vrednovati u korelaciji s histološkim, hematološkim ili biokemijskim podacima kao i s podacima o drugim vrstama sustavne toksičnosti. Ispitivanje koje se u ovoj metodi zahtijeva za karakterizaciju i kvantifikaciju neurotoksičnih reakcija obuhvaća posebne histopatološke i behaviorističke postupke koje je moguće dopuniti elektrofiziološkim i/ili biokemijskim istraživanjima (1)(2)(3)(4).

Neurotoksične tvari mogu različitim mehanizmima djelovati na čitav niz točaka u živčanom sustavu. Budući da niti jedan jedinstveni test nije u stanju u potpunosti procijeniti neurotoksični potencijal svih tvari, može biti potrebno primijeniti druge *in vivo* ili *in vitro* testove specifične za vrstu neurotoksičnosti koja se opaža ili se pridviđa.

Ova ispitna metoda može poslužiti, zajedno sa smjernicama OECD-a o strategijama i metodama za ispitivanje neurotoksičnosti (1), kao pomoć kod planiranja studija namijenjenih dodatnoj karakterizaciji odnosa doza-reakcija ili većoj osjetljivosti kvantifikacije tog odnosa, kako bi se dobila bolja procjena razine kod koje se ne opažaju štetni učinci ili kako bi se dokazali poznati ili očekivani rizici kemikalije. Primjerice, mogu se planirati studije namijenjene identifikaciji i vrednovanju jednog ili više neurotoksičnih mehanizama ili dopuni već postojećih podataka dobivenih iz primjene osnovnih postupaka opažanja ponašanja i neuropatoloških opažanja. U tim studijama ne treba duplicirati podatke do kojih bi se ionako došlo primjenom standardnih postupaka preporučenih ovom metodom, ako su ti podaci već dostupni i ne smatraju se nužnim za tumačenje rezultata studije.

Studijom neurotoksičnosti, kad se primjenjuje sama ili u kombinaciji, dolazi se do podataka pomoću kojih je moguće:

— utvrditi ima li ispitivana kemikalija na živčani sustav trajni ili reverzibilni učinak,

— doprinijeti karakterizaciji promjena živčanog sustava koje se dovode u vezu s izlaganjem kemikaliji, i boljem razumijevanju mehanizma koji na to utječe,

▼B

— odrediti odnose doza-reakcija i vrijeme-reakcija radi procjene razine kod koje nema opaženog štetnog učinka (razina koja se može primijeniti za utvrđivanje kriterija u pogledu sigurnosti kemikalije).

U ovoj ispitnoj metodi ispitivana tvar primjenjuje se oralno. Drugi putevi primjene (npr. dermalno ili inhalacijom) mogu biti prikladniji i za njih će možda trebati modificirati preporučene postupke. Odluka o izboru puta primjene uvjetovana je okolnostima izlaganja ljudi i dostupnim toksikološkim ili kinetičkim informacijama.

1.2. DEFINICIJE

Štetni učinak: svaka alteracija u odnosu na referentno stanje koja se pripisuje tretiranju, a koja umanjuje sposobnost organizma da preživi, da se razmnožava ili prilagodi okolišu.

Doza: količina primijenjene ispitivane tvari. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane tvari po jedinici mase pokusne životinje (npr. mg/kg) ili kao konstantne koncentracije u hrani (ppm).

Doziranje: općeniti pojam koji obuhvaća dozu, učestalost primjene doze i trajanje doziranja.

Neurotoksičnost: štetna promjena strukture ili funkcije živčanog sustava do koje dolazi uslijed izlaganja kemikaliji, biološkom ili fizikalnom agensu.

Neurotoksična tvar: svaka kemikalija, biološki ili fizikalni agens koji ima potencijal uzrokovanja neurotoksičnosti.

NOAEL: kratica za engleski izraz „no-observed-adverse-effects level” koji označava najvišu razinu doze kod koje se ne opažaju štetni učinci tretiranja.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar primjenjuje se na nekoliko skupina laboratorijskih glodavaca oralnim putem u cijelom rasponu doza. Obično se traži ponavljanje doze, a režim doziranja može biti 28-dnevni, subkronični (90 dana) ili kronični (1 godina ili dulje). Postupci utvrđeni u ovoj ispitnoj metodi mogu se primijeniti i za studiju akutne neurotoksičnosti. Životinje se ispituju kako bi se omogućilo otkrivanje ili karakterizacija neutroloških anomalija ili anomalija u ponašanju. Tijekom svakog razdoblja opažanja procjenjuju se razni aspekti ponašanja koji bi mogli biti posljedica neurotoksičnih tvari. Na kraju testa, na dijelu životinja svakog spola iz svake skupine provodi se perfuzija *in situ*, a od sekcija mozga, leđne moždine i perifernih živaca prave se pripravci koji se pregledavaju.

Ako se studija provodi kao samostalna studija radi probira na neurotoksičnost ili radi karakterizacije neurotoksičnih učinaka, životinje iz svih skupina koje nisu upotrijebljene za perfuziju i naknadnu histopatologiju (vidjeti tablicu 1.) mogu se upotrijebiti za specifična ispitivanja ponašanja, te posebne neuropatološke, neurokemijske ili elektrofiziološke postupke koji mogu dopuniti podatke dobivene standardnim opažanjima predviđenim ovom metodom (1). Ti dodatni postupci mogu biti posebno korisni ako empirijska opažanja ili očekivani učinci ukazuju na posebno ciljno tkivo ili posebnu vrstu neurotoksičnosti neke kemikalije. Druga je mogućnost da se preostale životinje iskoriste za vrednovanja kao što su ona predviđena u metodama ispitivanja toksičnosti uslijed primjene ponavljanih doza na glodavcima.

▼B

Kad se postupci ove ispitne metode kombiniraju s postupcima drugih ispitnih metoda, treba imati dovoljan broj životinja kako bi se zadovoljili zahtjevi opažanja u obje studije.

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Odabir životinjskih vrsta**

Poželjna vrsta glodavaca su štakori iako se mogu koristiti i druge vrste glodavaca ako se za to navede opravdani razlog. Treba koristiti mlade zdrave odrasle životinje sojeva koji se obično koriste u laboratorijskim istraživanjima. Ženke ne smiju prethodno imati potomstvo i ne smiju biti skotne. Primjena doza treba započeti čim prije nakon odbijanja od sise, najbolje prije nego što životinje napune šest tjedana a, u svakom slučaju, prije nego napune devet tjedana starosti. Međutim, ako se studija kombinira s drugim studijama, uvjet u pogledu starosti životinja možda će trebati prilagoditi. Na početku studije razlike u masi korištenih životinja trebaju biti minimalne i ne smiju prijeći ± 20 % od srednje mase životinja svakog spola. Ako se kao preliminarni test za dugoročnu studiju provodi studija s ponavljanjem doze, preporuča se u obje studije koristiti životinje istog soja i istog podrijetla.

1.4.2. **Uvjeti smještaja i prehrane**

Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Glasnu povremenu buku treba maksimalno smanjiti. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće. Na izbor hrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane tvari ako se ona daje u hrani. Životinje se mogu smjestiti odvojeno ili držati u kavezima u malim skupinama istog spola.

1.4.3. **Priprema životinja**

Zdrave mlade odrasle životinje biraju se nasumice i raspodjeljuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Kaveze treba urediti na način da se eventualni učinci držanja u kavezu svedu na minimum. Životinje se jednoznačno identificiraju i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka ispitivanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

1.4.4. **Put primjene i priprema doza**

Ova ispitna metoda bavi se posebno primjenom ispitivane tvari oralnim putem. Oralna primjena podrazumijeva primjenu želučanom sondom, u hrani, u vodi za piće ili kapsulama. Mogu se primijeniti i drugi putevi (npr. dermalno ili inhalacijom), ali za to će možda trebati modificirati preporučene postupke. Odluka o izboru puta primjene uvjetovana je o okolnostima izlaganja ljudi i dostupnim toksikološkim ili kinetičkim informacijama. Opravdanost odabira određenog puta primjene kao i eventualnih modifikacija postupaka ove ispitne metode treba dokazati.

▼B

Prema potrebi, ispitivana tvar može se otopiti ili suspendirati u odgovarajućem nosaču. Preporuča se kad god je to moguće prvo razmotriti upotrebu vodene otopine/suspenzije, pa onda otopinu/emulziju u ulju (npr. kukuruzno ulje), i na kraju eventualnu otopinu/suspenziju u drugom nosaču. Toksičke karakteristike nosača moraju biti poznate. Osim toga, treba uzeti u obzir sljedeće karakteristike nosača: učinci nosača na apsorpciju, distribuciju, metabolizam, ili zadržavanje ispitivane tvari; učinci na kemijska svojstva ispitivane tvari koji mogu modificirati njezine toksičke karakteristike; i učinci na potrošnju hrane ili vode ili nutritivno stanje životinja.

1.5. POSTUPCI

1.5.1. **Broj i spol životinja**

Kad se studija provodi kao zasebna, za vrednovanje detaljnih kliničkih i funkcionalnih opažanja treba koristiti najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka) u svakoj tretiranoj i kontrolnoj skupini. Na kraju studije, najmanje pet mužjaka i pet ženki odabranih od tih 10 mužjaka i 10 ženki uzima se za perfuziju *in situ* radi detaljne neurohistopatološke obrade. U slučajevima u kojima se znakovi neurotoksičnih učinaka opažaju na samo ograničenom broju životinja, treba razmotriti treba li te životinje uključiti među životinje koje se odabiru za perfuziju. Ako se ova studija provodi u kombinaciji sa studijom toksičnosti kod primjene ponavljane doze, treba imati dovoljan broj životinja kako bi se mogli zadovoljiti ciljevi obje studije. Minimalni broj životinja po skupini za razne kombinacije studija naveden je u tablici 1. Ako se planiraju usmrćenja u tijeku studije ili formiranje skupina namijenjenih opažanju reverzibilnosti učinaka, njihovog trajanja ili odgođene pojave toksičkih učinaka nakon tretiranja ili ako se predviđaju dodatna opažanja, broj životinja treba biti veći kako bi se osiguralo dovoljno životinja za opažanje i histopatologiju.

1.5.2. **Tretirana i kontrolna skupina**

Obično se koriste najmanje tri skupine na koje se primjenjuje doza i jedna kontrolna skupina, ali ako se iz procjene drugih podataka učinci ne očekuju kod ponavljane doze od 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan, može se provesti granični test. Ako odgovarajući podaci nisu dostupni, kao pomoć za određivanje doza može se provesti studija za utvrđivanje raspona doze. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u ispitnoj skupini. Ako se u primjeni doze koristi nosač, kontrolna skupina mora primiti taj nosač u najvećem upotrijebljenom obimu.

1.5.3. **Provjera pouzdanosti**

Laboratorij koji provodi studiju treba predočiti podatke kojima dokazuje svoju sposobnost za provođenje studije i osjetljivost postupaka koje koristi. Ti podaci trebaju osigurati očiti dokaz sposobnosti detekcije i kvantifikacije, prema potrebi, izmjena različitih kriterija koji se preporučaju za opažanje, kao što se autonomni znaci, osjetilna reaktivnost, jačina stiska ekstremiteta i motorna aktivnost. Informacije o kemikalijama koje uzrokuju razne tipove neurotoksičnih reakcija i mogu se upotrijebiti kao tvari za pozitivnu kontrolu mogu se naći u referencama od 2 do 9. Povijesni podaci mogu se upotrijebiti ako bitni aspekti pokusnih postupaka ostaju isti. Preporuča se periodično ažuriranje povijesnih podataka. Kad laboratorij koji provodi studiju izmijeni neki od bitnih elemenata provođenja testa ili postupaka, novim podacima treba dokazati da je osjetljivost postupaka održana.

▼B

1.5.4. **Odabir doze**

Visinu doze treba odabrati uzimajući u obzir eventualnu ranije opaženu toksičnost i kinetičke podatke dostupne za ispitivani spoj ili s njim povezane materijale. Najjaču dozu treba odabrati s ciljem da se izazovu neurotoksični učinci ili jasni sustavni toksični učinci. Nakon toga, treba odabrati slijed postepenog smanjivanja visine doze koji će dokazati reakcije na sve doze i najnižu dozu kod koje se ne opažaju štetni učinci (NOAEL vrijednosti). U načelu, visine doza treba tako odrediti da je primarne toksičke učinke na živčani sustav moguće razlikovati od učinaka koji se povezuju sa sustavnom toksičnošću. Često je optimalno doze primijeniti u dva do tri intervala, a možda je bolje dodati i četvrtu ispitnu skupinu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10). Ako postoji razumna procjena izloženosti ljudi, to treba također uzeti u obzir.

1.5.5. **Granični test**

Ako istraživanje provedeno primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan u skladu s postupcima opisanim u ovoj studiji ne proizvede opažene toksičke učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih spojeva ne treba očekivati toksičnost, u takvim slučajevima može se smatrati da provođenje potpunog istraživanja s nekoliko visina doza nije neophodno. Očekivana izloženost ljudi može ukazati na potrebu da se u graničnom testu primijeni viša doza. Za druge puteve primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, fizikalno–kemijska svojstva ispitivane tvari često mogu određivati i ograničavati najvišu moguću razinu izlaganja koja se može postići. Za provođenje studije akutne oralne toksičnosti, doza za granični test treba biti najmanje 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Primjena doza**

Životinjama treba davati doze ispitivane tvari svakodnevno, 7 dana u tjednu, tijekom 28 dana; opravdanost primjene petodnevnog režima doziranja ili kraćeg razdoblja izlaganja potrebno je dokazati. Ako se ispitivana tvar daje na sondu, to treba učiniti primjenom jednokratne doze pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koja se daje odjednom ovisi o veličini ispitnih životinja. Taj volumen ne smije prijeći 1 ml/100 g tjelesne mase. Međutim kod vodenih otopina moglo bi se koristiti do 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim kod nadražujućih i nagrizajućih tvari, za koje je normalno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena treba podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod svih visina doze osigurao stalni volumen.

Za tvari koje se daju u hrani ili vodi za piće, važno je osigurati da količine ispitivane tvari o kojoj se radi nemaju utjecaja na uobičajen unos hrane ili vode. Ako se ispitivana tvar daje u hrani, može se koristiti stalna koncentracija u hrani (ppm) ili stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje; treba navesti koja se od te dvije mogućnosti koristi. Za tvar koja se daje na sondu, dozu treba davati u podjednako vrijeme svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Ako se studija s ponavljanom primjenom doze koristi kao preliminarna za dugoročnu studiju, preporuča se u obje studije primijeniti sličnu prehranu. Za studije akutnih učinaka, ako nije moguća primjena jedne doze, doza se može davati u malim frakcijama tijekom najviše 24 sata.

▼B

1.6. OPAŽANJA

1.6.1. **Učestalost opažanja i testova**

U studijama s ponavljanim dozama, razdoblje opažanja treba obuhvatiti razdoblje doziranja. U studijama akutne toksičnosti treba opažati 14-dnevno razdoblje nakon tretiranja. Za životinje u satelitskim skupinama koje se u razdoblju nakon tretiranja drže bez izlaganja, opažanjima treba obuhvatiti i to razdoblje.

Opažanja treba provoditi dovoljno često kako bi se postigla maksimalna vjerojatnost otkrivanja anomalija u ponašanju i/ili neuroloških anomalija. Opažanja je poželjno provoditi u isto vrijeme svakog dana vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Učestalost kliničkih opažanja i funkcionalnih testova sažeto je prikazana u tablici 2. Ako kinetički ili drugi podaci dobiveni iz prethodnih studija ukazuju na potrebu uporabe drugačijih vremenskih rokova za opažanja, testove ili razdoblja nakon opažanja, treba donijeti alternativni plan, kako bi se prikupio maksimalan broj informacija. Opravdanost izmjene plana treba dokazati.

1.6.1.1. *Opažanja općeg zdravstvenog stanja i mortalitet/morbiditet*

Opažanja s obzirom na zdravstveno stanje treba provoditi na svim životinjama najmanje jednom dnevno, a najmanje dva puta dnevno treba provjeravati ima li slučajeva pobolijevanja ili smrti.

1.6.1.2. *Detaljna klinička opažanja*

Detaljna klinička opažanja svih životinja odabranih u tu svrhu (vidjeti tablicu 1.) treba provoditi jednom prije prvog izlaganja (kako bi se omogućila usporedba na istom subjektu), a nakon tog u različitim intervalima, u zavisnosti od trajanja studije (vidjeti tablicu 2.). Detaljna klinička opažanja na satelitskim skupinama namijenjenim opažanju reverzibilnosti učinaka treba provesti na kraju razdoblja rekuperacije. Detaljna klinička opažanja treba provoditi izvan kaveza u kojima se životinje drže, u standardnom ograđenom prostoru. Opažanja treba pažljivo bilježiti, koristeći sustav određivanja rezultata koji obuhvaća kriterije ili skale za svako mjerenje u okviru opažanja. Te kriterije ili skale jasno definira ispitni laboratorij. Treba učiniti sve što je potrebno da variranje ispitnih uvjeta bude minimalno (da nije sustavno povezano s tretiranjem) i da opažanja obavljaju osposobljene osobe koje nemaju saznanja da se tretiranje zaista provodi.

Preporuča se opažanja provoditi strukturirano, sustavnom primjenom dobro utvrđenih kriterija (uključujući definiranje što je to standardni „raspon”) na svaku životinju prilikom svakog pojedinog opažanja. „Standardni raspon” treba odgovarajuće dokumentirati. Sve opažene znakove treba bilježiti. Kad kod je to moguće, treba zabilježiti i značaj opaženih znakova. Kliničkim opažanjima treba obuhvatiti, a ne ih ograničiti na promjene na koži, dlaci, očima, sluznici, na pojavu iscjedaka i izlučina, i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija, piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju i/ili disanje na usta, svi neuobičajeni znaci uriniranja ili defekacije te urin bez boje),

▼B

Također treba zabilježiti i sve neuobičajene reakcije s obzirom na položaj tijela, razinu aktivnosti (npr. povećano ili smanjeno iskorištavanje standardnog prostora izvan kaveza) i koordinaciju pokreta. Treba zabilježiti i promjene u hodu (npr. šepanje, ataksija), držanju (primjerice zgrbljenost) i reakciju na manipulaciju, postavljanje ili druge podražaje okoline kao i pojavu kloničnih ili toničnih pokreta, konvulzija ili tremora, stereotipnog ponašanja (npr. prekomjerno njegovanje dlake, neobični pokreti glave, stalno kretanje u krug) ili čudnog ponašanja (npr. griženje ili pretjerano lizanje, samoranjavanje, hodanje unatrag, vokalizacija) ili agresiju.

1.6.1.3. ***Funkcionalna ispitivanja***

Slično detaljnim kliničkim opažanjima, i funkcionalne pokuse na životinjama odabranim u tu svrhu (vidjeti tablicu 1.) treba provesti jednom prije izlaganja i zatim provoditi često. Učestalost funkcionalnih pokusa ovisi i o trajanju studije (vidjeti tablicu 2.). Osim u razdobljima kliničkih opažanja kako su navedena u tablici 2., funkcionalna opažanja na satelitskim skupinama namijenjenim opažanju reverzibilnosti učinaka treba provesti što neposrednije pred planirano usmrćivanje na kraju pokusa. Funkcionalnim pokusima treba obuhvatiti osjetilnu reakciju na podražaje raznih vrsta (npr. auditivne, vizualne i proprioceptivne podražaje (5)(6)(7)), procjenu sposobnosti stiska ekstremiteta (8) i procjenu motorne aktivnosti. Motornu aktivnost treba mjeriti automatskim uređajem koji je u stanju detektirati i smanjenja i povećanja aktivnosti. Ako se koristi neki drugi definirani sustav, isti mora biti kvantitativan, a njegovu pouzdanost i osjetljivost treba dokazati. Svaki uređaj treba ispitati kako bi se kod svih osigurala trajna pouzdanost i međusobna usklađenost. Dodatni detalji o postupcima koji se mogu primijeniti nalaze se u referencama. U nedostatku pokazatelja potencijalnih neurotoksičnih učinaka (npr. podataka o odnosu struktura-aktivnost, epidemioloških podataka, drugih toksikoloških studija), treba predvidjeti specijalizirane testove osjetilnih i motornih funkcija ili pamćenja i sposobnosti učenja kojima bi se ti mogući učinci mogli još detaljnije proučiti. Više informacija o tim specijaliziranim testovima i njihovoj primjeni navedeno je u (1).

Iznimno se funkcionalna ispitivanja mogu izostaviti kod životinja koje inače pokazuju znakove toksičnosti takvog stupnja da bi to moglo utjecati na izvedbu ispitivanja. Opravdanost odluke da se životinje isključe iz funkcionalnog ispitivanja treba dokazati.

1.6.2. **Tjelesna masa i potrošnja hrane/vode**

Kod studija u trajanju do 90 dana, sve životinje treba vagati najmanje jednom tjedno i najmanje jednom tjedno treba mjeriti potrošnju hrane (potrošnju vode, ako se ispitivana tvar primjenjuje tim putem). Kod dugoročnih studija, sve životinje treba vagati najmanje jednom tjedno prvih 13 tjedana, a nakon toga najmanje jednom svaka četiri tjedna. Mjerenje potrošnje hrane (i potrošnje vode ako se ispitivana tvar primjenjuje tim putem) treba provoditi najmanje jednom tjedno prvih 13 tjedana, a zatim u otprilike tromjesečnim intervalima, ako zdravstveno stanje ili promjene tjelesne mase ne zahtijevaju drugačije.

▼B

1.6.3. **Oftalmologija**

Za studije dulje od 28 dana oftalmološki pregled uz korištenje oftalmoskopa ili sličnog odgovarajućeg instrumenta treba obaviti prije primjene ispitivane tvari i po završetku studije, poželjno na svim životinjama, ili barem na životinjama iz skupina kod koje je primjenjivana velika doza i na životinjama iz kontrolne skupine. Ako se primijete promjene u očima ili ako klinički znakovi ukazuju da je to potrebno, treba pregledati sve životinje. Kod dugoročnih studija, oftalmološki pregled također treba obavljati nakon 13 tjedana. Oftalmološke preglede ne treba obavljati ako su ovi podaci već dostupni iz drugih studija sličnog trajanja i sličnih visina doze.

1.6.4. **Hematologija i klinička biokemija**

Ako se studija neurotoksičnosti provodi u kombinaciji sa studijom sustavne toksičnosti kod ponavljanih doza, treba provesti hematološke preglede i klinička biokemijska određivanja utvrđena u odgovarajućoj metodi studije sustavne toksičnosti. Prikupljanje uzoraka treba obaviti na način da eventualni potencijalni učinci neurotoksičnosti na ponašanje budu minimalni.

1.6.5. **Histopatologija**

Neuropatološkim pregledom treba dopuniti i proširiti opažanja provedena u *in vivo* fazi studije. Tkiva najmanje pet životinja/spolu/skupini (vidjeti tablicu 1. i slijedeći stavak) treba fiksirati *in situ*, korištenjem opće priznatih tehnika perfuzije i fiksiranja (vidjeti referencu 3. poglavlje 5. i referencu 4. poglavlje 50.). Sve uočljive velike promjene treba zabilježiti. Ako se studija provodi kao samostalna studija radi probira na neurotoksičnost ili radi karakterizacije neurotoksičnih učinaka, preostale životinje mogu se upotrijebiti za specifična ispitivanja ponašanja (10)(11), te posebne neuropatološke (10)(11)(12)(13), neurokemijske (10)(11)(14)(15), ili elektrofiziološke postupke (10)(11)(16)(17) koji mogu dopuniti ovdje opisane podatke i ispitivanja, ili kao dodatni broj životinja za histopatološku analizu. Ti dodatni postupci posebno su korisni ako empirijska opažanja ili očekivani učinci ukazuju na posebnu vrstu ili poseban cilj neurotoksičnosti (2)(3). Druga je mogućnost da se preostale životinje iskoriste za rutinska patološka vrednovanja opisana u metodama za studije s ponavljanim dozama.

Na svim uzorcima tkiva uklopljenim u parafin treba provesti opći postupak bojenja, npr. hematoksilin i eozin (H&E) i mikroskopski ih pregledati. Ako se opaze znakovi periferne neuropatije ili se na njih sumnja, treba pregledati uzorke perifernog živčanog tkiva uklopljene u plastiku. Klinički znakovi isto tako mogu ukazati da je potrebno pregledati i dodatne lokacije ili primijeniti posebne postupke bojenja. Smjernice o dodatnim lokacijama koje treba pregledati mogu se naći u (3)(4). Odgovarajuće posebne boje mogu biti od pomoći i za dokazivanje posebnih tipova patoloških promjena (18).

▼B

Reprezentativne sekcije središnjeg i perifernog živčanog sustava treba histopatološki pregledati (vidjeti referencu 3. poglavlje 5. i referencu 4. poglavlje 50.). Pregledom treba obuhvatiti sljedeća područja: veliki mozak, središnji dio cerebruma, uključujući sekciju hipokampusa, srednji mozak, *cerebellum*, Varolijev most, *mendulla oblongata*, oko s vidnim živcem i mrežnicom, leđnu moždinu na cervikalnom i lumbarnom zadebljanju, spinalne ganglije, dorsalne bazalne ganglije, dorsalno i ventralno bazalno tkivo, proksimalni bedreni živac, proksimalni tibijalni živac (na koljenu) i ogranke tibijalnog živca u lisnom mišiću. Sekcije leđne moždine i perifernog živca trebaju obuhvatiti kako poprečne ili dijagonalne tako i uzdužne sekcije. Pozornost treba obratiti na krvne žile živčanog sustava. Treba pregledati i jedan uzorak skeletnog mišića, posebno lisnog mišića. Posebno treba paziti na lokacije stanične ili vlaknaste strukture i uzorka u središnjem živčanom sustavu (CNS) i perifernom živčanom sustavu (PNS) za koje se zna da su posebno podložni učincima neurotoksičnih tvari.

Smjernice u pogledu neuropatoloških alteracija koje su obično rezultat izlaganja toksičnoj tvari mogu se naći u referencama (3)(4). Preporuča se stupnjevani pregled uzoraka tkiva, na način da se sa sekcijama iz kontrolne skupine prvo uspoređuju sekcije iz skupine koja je primala veliku dozu. Ako u uzorcima iz tih skupina nisu opažene neuropatološke alteracije, daljnje analize nisu potrebne. Ako su u skupini koja je primala veliku dozu neuropatološke alteracije opažene, uzorak svakog od potencijalno ugroženog tkiva iz skupina koje su primale srednju i malu dozu treba kodirati i naknadno pregledati.

Ako je prisutnost neuropatoloških alteracija utvrđena u kvalitativnom ispitivanju, sve regije živčanog sustava u kojima su prisutne alteracije treba još jednom pregledati. U svim dozirnim skupinama, sekcije svake potencijalno ugrožene regije treba šifrirati i nasumice pregledati bez saznanja o šiframa. Učestalost i težinu svake lezije treba zabilježiti. Nakon što je provedena procjena svih regija iz svih dozirnih skupina, kodovi se dešifriraju i provodi se statistička analiza kojom se vrednuju odnosi doza-reakcija. Primjere različitih stupnjeva težine svake lezije treba opisati.

Neuropatološke nalaze treba vrednovati u kontekstu opažanja i mjerenja ponašanja, kao i drugih podataka iz prethodnih ili paralelnih studija sustavne toksičnosti ispitivane tvari.

2. PODACI

2.1. OBRADA PODATAKA

Treba osigurati pojedinačne podatke. Dodatno, sve podatke treba sažeti u tablici u kojoj treba navesti broj životinja u svakoj tretiranoj ili kontrolnoj skupini na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom pokusa ili su usmrćene iz humanih razloga i vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis opaženih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i težinu toksičkih učinaka, broj životinjama s lezijama, uključujući vrstu i težini lezije ili lezija.

▼B

2.2. VREDNOVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

Nalaze ovog istraživanja treba vrednovati s obzirom na učestalost, težinu i korelaciju učinaka neurotoksičnih tvari na ponašanje i neuropatoloških učinaka (i neurokemijskih ili elektrofizioloških učinaka ako su dodatna ispitivanja uključena) i svih ostalih uočenih štetnih učinaka. Kad je to moguće, numeričke rezultate treba vrednovati odgovarajućom opće prihvaćenom statističkom metodom. Odabir statističke metode provodi se u vrijeme planiranja studije.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

ispitivana tvar:

— fizikalna priroda (uključujući izomeriju, čistoću i fizikalno-kemijska svojstva),

— identifikacijski podaci.

Nosač (ako je primjenljivo):

— opravdanost odabira nosača.

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta/soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, aklimatizacija, prehrana itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja.

Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o formulaciji ispitivane tvari/pripravku u hrani, postignutoj koncentraciji, stabilnosti i homogenosti pripravka,

— specifikacija primijenjenih doza, uključujući pojedinosti o nosaču, volumenu i fizičkom obliku primijenjenog materijala,

— pojedinosti o primjeni ispitivane tvari,

— obrazloženje razloga za odabir visina doze,

— obrazloženje razloga za odabir puta i trajanja izlaganja,

— način preračunavanja koncentracije ispitivane tvari u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne mase/dan), ako je primjenljivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Opažanja i ispitni postupci:

— pojedinosti o raspoređivanju životinja iz svake skupine u podskupine za perfuziju,

— pojedinosti o sustavu bodovanja rezultata, uključujući kriterije i vrijednosti za određivanje rezultata za svako mjerenje u detaljnim kliničkim opažanjima,

▼B

— pojedinosti o funkcionalnim pokusima za osjetilnu reakciju na podražaje različitih modaliteta (npr. auditivne, vizualne i propioceptivne), za procjenu sposobnosti stiska ekstremiteta i procjenu motorne aktivnosti (uključujući pojedinosti o automatskim uređajima za detekciju aktivnosti) i drugim primijenjenim postupcima,

— pojedinosti o oftalmološkim pregledima i, prema potrebi, hematološkim pregledima i kliničkim biokemijskim pokusima s relevantnim početnim vrijednostima,

— pojedinosti o posebnim neurobiheviourističkim, neuropatološkim, neurokemijskim ili elektrofiziološkim postupcima.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene tjelesne mase uključujući tjelesnu masu kod usmrćenja,

— potrošnja hrane i potrošnja vode, ako je primjerno,

— podaci o toksičnoj reakciji po spolu i visini doze, uključujući znakove toksičnosti ili mortaliteta,

— karakter, težina i trajanje (vrijeme prve pojave i daljnji tijek) detaljnih kliničkih opažanja (bez obzira jesu li učinci reverzibilni ili ne),

— detaljan opis svih rezultata funkcionalnih testova,

— nalazi nekropsije,

— detaljan opis svih neurobiheviourističkih, neuropatoloških, neurokemijskih ili elektrofizioloških nalaza, ako su dostupni,

— podaci o apsorpciji i metabolizmu, ako su dostupni,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima:

— informacija o odnosu doza-reakcija,

— utjecaj bilo kojih drugih toksičnih učinaka na donošenje zaključka o neurotoksičnom potencijalu ispitivane tvari,

— visina doze kod koje se ne opažaju štetni učinci.

Zaključci:

— potiče se davanje konkretne izjave o sveukupnoj neurotoksičnosti ispitivane kemikalije.

4. **REFERENCE**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organisation (WHO) (1986) Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, str. 999-1003.

(6) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, str. 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, str. 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T., (1979) A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, str. 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, str. 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds., (1992) Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed., (1995) Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B., (1991) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, str. 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, str. 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, str. 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, str. 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, str. 299-335.

(17) Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, str. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tablica 1.

Minimalni broj životinja po skupini za studije neurotoksičnosti koje se provode zasebno ili u kombinaciji s drugim studijama

	STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI PROVEDENA KAO:			
	Zasebna studija	Studija kombinirana s 28-dnevnom studijom	Studija kombinirana s 90-dnevnom studijom	Studija kombinirana sa studijom kronične toksičnosti
Ukupan broj životinja po skupini	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	15 mužjaka i 15 ženki	25 mužjaka i 25 ženki
Broj životinja odabranih za funkcionalno ispitivanje uključujući detaljna klinička opažanja	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki
Broj životinja odabranih za perfuziju *in situ* i neurohistopatologiju	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki
Broj životinja odabranih za opažanja toksičnosti kod primjene ponavljane doze/subkronične toksičnosti/kronične toksičnosti, hematologiju, medicinsku biokemiju, histopatologiju itd. kako je navedeno u odgovarajućim smjernicama		5 mužjaka i 5 ženki	10 mužjaka (†) i 10 ženki (†)	20 mužjaka (†) i 20 ženki (†)
Dodatna opažanja, prema potrebi	5 mužjaka i 5 ženki			

† Uključuje pet životinja odabranih za funkcionalno ispitivanje i detaljna klinička opažanja kao dio studije neurotoksičnosti.

▼B

Tablica 2.

Učestalost kliničkog opažanja i funkcionalnih pokusa

Vrsta opažanja		Trajanje studije			
		Akutni učinci	28-dana	90-dana	Kronični učinci
Kod svih životinja	Opće zdravstveno stanje	dnevno	dnevno	dnevno	dnevno
	Mortalitet/morbiditet	Dva puta dnevno	Dva puta dnevno	Dva puta dnevno	Dva puta dnevno
Kod životinja odabranih za funkcionalna opažanja	Detaljna klinička opažanja	— prije prvog izlaganja — u roku od 8 sati nakon doziranja u vrijeme kad se očekuje najveći učinak — na 7. i 14. dan nakon doziranja	— prije prvog izlaganja — nakon toga jednom tjedno	— prije prvog izlaganja — jednom tijekom prvog ili drugog tjedna izlaganja — nakon toga jednom mjesečno	— prije prvog izlaganja — jednom na kraju prvog mjeseca izlaganja — nakon toga svaka tri mjeseca
	Funkcionalna ispitivanja	— prije prvog izlaganja — u roku od 8 sati nakon doziranja u vrijeme kad se očekuje najveći učinak — na 7. i 14.dan nakon doziranja	— prije prvog izlaganja — tijekom četvrtog tjedna tretiranja što je moguće bliže kraju razdoblja izlaganja	— prije prvog izlaganja — jednom tijekom prvog ili drugog tjedna izlaganja — nakon toga jednom mjesečno	— prije prvog izlaganja — jednom na kraju prvog mjeseca izlaganja — nakon toga svaka tri mjeseca

▼B

B.44. **APSORPCIJA PUTEM KOŽE: METODA *IN VIVO***

1. **METODA**

Ova je ispitna metoda ekvivalentna metodi iz Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 427 (2004.).

1.1. UVOD

Izlaganje mnogim kemikalijama događa se uglavnom putem kože dok se u većini toksikoloških studija koje se provode na laboratorijskim životinjama koristi oralni put primjene. Studija perkutane apsorpcije *in vivo* opisana u ovoj smjernici nudi poveznice potrebne za ekstrapolaciju rezultata iz studija s oralnim putem primjene, prilikom procjenjivanja sigurnosti nakon izlaganja dermalnim putem.

Prije nego dođe do krvotoka, tvar mora proći kroz čitav niz slojeva stanice kože. Sloj koji se kod većine kemikalija uzima za određivanje brzine prolaza je *stratum corneum* koji se sastoji od mrtvih stanica. Permeabilnost kože ovisi kako o lipofilnosti kemikalije tako i o debljini vanjskog sloja epiderme i čimbenicima kao što su molekulska masa i koncentracija tvari. Općenito, koža štakora i zečeva permeabilnija je nego koža čovjeka, dok je permeabilnost kože zamoraca i majmuna sličnija permeabilnosti ljudske kože.

Metode za mjerenje perkutane apsorpcije mogu se podijeliti u dvije kategorije: *in vivo* i *in vitro*. Metodom *in vivo* dobivaju se dobre informacije o apsorpciji putem kože kod raznih laboratorijskih vrsta. Metode *in vitro* razvijene su u novije vrijeme. U njima se primjenjuje prijenos kroz punu ili djelomičnu debljinu životinjske ili ljudske kože na spremnik fluida. Metoda *in vitro* opisana je u posebnoj metodi ispitivanja (1). Za pomoć pri odabiru najprimjerenije metode u određenoj situaciji, preporuča se konzultirati smjernice OECD-a za provođenje studija apsorpcije putem kože (2), koje daju više pojedinosti o prikladnim *in vivo* i *in vitro* metodama.

Ovdje opisana metoda *in vivo* omogućuje određivanje penetracije ispitivane tvari kroz kožu u segment sustava. Tehnika je u širokoj primjeni niz godina (3)(4)(5)(6)(7). Iako studija perkutane apsorpcije *in vitro* može biti primjerena u mnogim slučajevima, ima situacija u kojima je do potrebnih podataka moguće doći samo studijom *in vivo*.

Prednosti metode *in vivo* su u tome što se u njoj koristi sustav koji je intaktni u pogledu fiziologije i metabolizma, što se koriste vrste koje se koriste i u mnogim drugim studijama toksičnosti i što se može modificirati za primjenu drugih vrsta. Nedostaci su korištenje živih životinja, potreba da se radi dobivanja pouzdanih rezultata koristi materijal obilježen radioaktivnim izotopom, poteškoće u određivanju rane faze apsorpcije i razlike u permeabilnosti kože poželjnih vrsta (štakori) i ljudske kože. Životinjska koža općenito je permeabilnija, pa se uslijed tog može dogoditi da se procijeni veća perkutana apsorpcija kod čovjeka (6)(8)(9). Kaustične/nagrizajuće tvari ne treba ispitivati na živim životinjama.

▼B

1.2. DEFINICIJE

Neapsorbirana doza: predstavlja količinu opranu s površine kože nakon izlaganja, i eventualno prisutnu količinu na neokluzivnom oblogu te svaku količinu za koju se dokaže da je ishlapila iz kože tijekom izlaganja.

Apsorbirana doza (*in vivo*): obuhvaća količine prisutne u urinu, tekućini s kojom je opran kavez, fekalijama, izdahnutom zraku (ako se mjeri), krvi, tkivu (ako se skuplja) i preostalim truplima, nakon uklanjanja s kože na mjestu primjene.

Doza koja se može apsorbirati: predstavlja dozu prisutnu na ili u koži nakon pranja.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar za koju je poželjno da bude obilježena radioaktivnim izotopom primjenjuje se na životinjsku kožu s koje je skinuta dlaka, u jednoj ili više odgovarajućih jačina doze u obliku reprezentativnog pripravka koji je u općoj upotrebi. Ispitni pripravak ostavi se u dodiru s kožom točno utvrđeno vrijeme pod oblogom (neokluzivnim, poluokluzivnim, ili okluzivnim) kako ga životinja ne bi progutala. Prije, za vrijeme i nakon izlaganja životinje se smještaju u zasebne metaboličke kaveze, a izlučevine i izdahnuti zrak se u tom razdoblju skupljaju za analizu. Skupljanje izdahnutog zraka može se izostaviti ako postoji dovoljno informacija koje potvrđuju da hlapljivih radioaktivnih metabolita nema ili da nastaju u malom broju. Svaka studija obično obuhvaća nekoliko skupina životinja koje se izlažu ispitnom pripravku. Jedna skupina se na kraju razdoblja izlaganja usmrćuje. Druge se skupine usmrćuju u planiranim vremenskim intervalima nakon toga (2). Na kraju uzorkovanja, preostale životinje se usmrćuju, krv se skuplja za analizu, mjesto primjene se odstranjuje za analizu, a truplo se analizira na prisutnost neočekivanog materijala. Uzorci se analiziraju odgovarajućim metodama i procjenjuje se stupanj perkutane apsorpcije (6)(8)(9).

1.4. OPIS METODE

1.4.1. **Odabir životinjskih vrsta**

Najčešće upotrebljavana vrsta su štakori, ali mogu se koristi i druge vrste i sojevi bez dlake čija je brzina apsorpcije u koži sličnija apsorpciji kod ljudi (3)(6)(7)(8)(9). Treba upotrebljavati mlade zdrave životinje samo jednog spola (zadani spol je muški) iz sojeva koji se obično koriste u laboratoriju. Na početku studije razlike u masi korištenih životinja ne smiju prijeći ± 20 % vrijednosti srednje mase. Pogodni su npr. štakori muškog spola, težine 200 g – 250 g, posebno u gornjoj polovici tog područja.

▼B

1.4.2. **Broj i spol životinja**

Za svaki ispitni pripravak i svako planirano vrijeme završetka treba koristiti skupinu od najmanje četiri životinje jednog spola. Pojedinačne skupine životinja usmrtit će se u različitim vremenskim intervalima, npr. na kraju razdoblja izlaganja (obično 6 ili 24 sata) i zatim u daljnjim rokovima (npr. 48 i 72 sata). Ako su dostupni podaci koji dokazuju značajne razlike dermalne toksičnosti između mužjaka i ženki, treba odabrati osjetljiviji spol. Ako takvi podaci ne postoje, može se upotrijebiti bilo koji spol.

1.4.3. **Uvjeti smještaja i prehrane**

Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana koja treba biti dostupna po volji i s neograničenom količinom vode za piće. Za vrijeme studije, a poželjno je i tijekom aklimatizacije, životinje se smještaju pojedinačno u metaboličke kaveze. Budući da bi rasipanje hrane i vode moglo dovesti do sumnjivih rezultata, vjerojatnost takvih događaja treba minimalizirati.

1.4.4. **Priprema životinja**

Životinje se označavaju radi pojedinačne identifikacije i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka studije kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

Nakon razdoblja aklimatizacije i približno 24 sata prije doziranja, na leđnom i hrptenom dijelu trupa životinja treba ukloniti dlaku šišanjem. Pri tome treba izbjeći struganje kože, jer se karakteristike propusnosti oštećene kože razlikuju od propusnosti intaktne kože. Nakon šišanja i približno 24 sata prije primjene ispitivane tvari na kožu (vidjeti odjeljak 1.4.7.), površinu kože treba obrisati acetonom kako bi se odstranio sebum. Dodatno pranje vodom i sapunom ne preporuča se jer eventualni talog sapuna može povećati apsorpciju ispitivane tvari. Površina mora biti dovoljno velika kako bi omogućila pouzdan izračun apsorbirane količine ispitivane tvari po cm^2, a poželjno je da bude najmanje 10 cm^2. Takvu je površinu moguće postići kod štakora tjelesne mase 200-250 g. Nakon pripreme, životinje se vraćaju u metaboličke kaveze.

1.4.5. **Ispitivana tvar**

Ispitivana tvar je proizvod čije karakteristike penetracije se proučavaju. U idealnom slučaju, ispitivana tvar treba biti obilježena radioaktivnim izotopom.

1.4.6. **Priprema ispitivanja**

Pripravak ispitivane tvari (npr. čisti, razrijeđeni ili formulirani materijal koji sadrži ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje na kožu) treba biti isti (ili predstavljati realističan surogat) kao i pripravak kojem bi mogli biti izloženi ljudi ili druge potencijalne ciljne vrste. Prema potrebi, ispitivana se tvar otapa ili suspendira u odgovarajućem otapalu ili nosaču. Za sve nosače osim vode trebaju biti poznate karakteristike apsorpcije i potencijalna interakcija s ispitivanom tvari.

▼B

1.4.7. **Primjena na kožu**

Na površini kože odredi se mjesto primjene određene veličine. Poznata količina pripravka ravnomjerno se nanese na mjesto primjene. Ta bi količina trebala odgovarati količini kojoj bi potencijalno mogli biti izloženi ljudi, obično 1-5 mg/cm^2 za krute tvari ili do 10 µl/cm^2 za tekućine. Opravdanost svih drugih količina treba dokazati očekivanim uvjetima upotrebe, ciljevima studije ili fizikalnim karakteristikama ispitnog pripravka. Nakon primjene, tretirano mjesto treba zaštiti kako ga životinja ne bi lizala. Primjer tipičnog uređaja prikazan je na slici 1. Mjesto primjene obično se zaštiti neokluzivnim oblogom (npr. propusnim najlonskim oblogom). Međutim, kod neograničene primjene mjesto primjene treba biti okluzivno zaštićeno. U slučaju kad isparavanje poluhlapljivih ispitivanih tvari u neprihvatljivoj mjeri smanjuje brzinu rekuperacije ispitivane tvari (vidjeti također odjeljak 1.4.10., prvi stavak), isparenu tvar treba sakupljati na ugljenom filtru na poklopcu uređaja (vidjeti sliku 1.). Važno je da niti jedan uređaj ne oštećuje kožu, da ne apsorbira ispitni pripravak i da ne reagira s njim. Životinje se vraćaju svaka u svoj kavez kako bi se sakupile njihove izlučevine.

1.4.8. **Trajanje izlaganja i uzorkovanje**

Trajanje izlaganja vremenski je interval između primjene i odstranjivanja ispitnog pripravka ispiranjem kože. Treba primijeniti relevantno razdoblje izlaganja (obično 6 ili 24 sata), temeljeno na očekivanom trajanju izlaganja ljudi. Nakon razdoblja izlaganja, životinje se drže u metaboličkim kavezima do planiranog uništenja. U redovitim intervalima tijekom cijelog trajanja studije životinje treba opažati na znakove toksičnosti/abnormalne reakcije. Na kraju razdoblja izlaganja tretiranu kožu treba opažati na vidljive znakove nadraženosti.

Metabolički kavezi trebaju omogućiti zasebno skupljanje urina i fekalija cijelo vrijeme studije. Isto tako trebaju omogućiti skupljanje ugljikovog dioksida obilježenog izotopom ^{14}C i hlapljivih ugljikovih spojeva obilježenih izotopom ^{14}C, koje treba analizirati ako se jave u količinama > 5 %. Urin, fekalije i isparene fluide (npr. ugljikov dioksid obilježen izotopom ^{14}C i hlapljive ugljikove spojeve obilježene izotopom ^{14}C) treba skupljati pojedinačno iz svake skupine u svako vrijeme uzorkovanja. Ako postoji dovoljno informacija koje potvrđuju da hlapljivi radioaktivni metaboliti nastaju u malom broju ili da ih nema, mogu se koristiti otvoreni kavezi.

Izlučevine se skupljaju tijekom razdoblja izlaganja, do 24 sata nakon prvog dodira s kožom, a zatim svakodnevno do završetka pokusa. Iako su tri intervala skupljanja izlučevina obično dovoljna, za konkretnu studiju mogu se odrediti dodatne ili primjerenije vremenske točke skupljanja izlučevina, prema predviđenoj svrsi ispitnog pripravka ili postojećim kinetičkim podacima.

Na kraju razdoblja izlaganja, zaštita se skida sa životinja i pojedinačno pohranjuje za analizu. Tretiranu kožu životinja treba isprati najmanje tri puta agensom za čišćenje i odgovarajućim sredstvima za brisanje. Treba paziti da se ne onečiste drugi dijelovi tijela. Agens za čišćenje treba biti reprezentativan za uobičajene postupke obavljanja higijene, npr. vodena otopina sapuna. Na kraju kožu treba osušiti. Sva sredstva za brisanje i sredstva kojima je pranje provedeno treba sačuvati za analizu. Životinjama u posljednjim skupinama koje su sudjelovale u pokusu, prije povratka u pojedinačne kaveze na tretirano mjesto treba staviti svježi zavoj.

▼B

1.4.9. **Postupci usmrćenja**

U svakoj skupini, životinje treba usmrtiti pojedinačno, u planirano vrijeme i skupiti krv za analizu. Zaštitno sredstvo ili oblog treba skinuti za analizu. Sa svake životinje, za posebnu analizu treba skinuti kožu s mjesta primjene i sličnu površinu netretirane, ošišane kože. Mjesto primjene može se frakcionirati kako bi se *stratum corneum* odvojio od epidermalne podloge i na taj način dobilo više informacija o tome kako je ispitivana kemikalija raspoređena. Analiza tog razmještaja u vremenu nakon razdoblja izlaganja treba pokazati sudbinu ispitivane tvari u *stratum corneum*. Radi lakšeg frakcioniranja kože (nakon završnog pranja kože i usmrćivanja životinja) skida se svaki zaštitni oblog. Koža na mjestu primjene, zajedno s prstenastim pojasom okolne kože, izreže se iz životinje i pribadačama pričvrsti na ploču. Na površinu kože lagano se pritisne ljepljiva traka koja se zatim skine zajedno s dijelom *stratum corneum.* Taj se postupak ponavlja sve dok se traka više ne lijepi za površinu, što znači da je *stratum corneum* u potpunosti odstranjen. Sve ljepljive trake za svaku životinju mogu se držati u jednoj posudi u koju se doda stimulator digestije tkiva kako bi se *stratum corneum* otopio. Sva potencijalna ciljna tkiva mogu se odstraniti za zasebna mjerenja prije nego se preostalo truplo analizira s obzirom na dozu apsorbiranu u truplu. Trupla pojedinačnih životinja treba zadržati za analizu. Obično će biti dostatna analiza sveukupnog sadržaja. Ciljni organi mogu se izvaditi za zasebnu analizu (ako je indicirana drugim studijama). Urin koji se nalazi u mjehuru u vrijeme planiranog usmrćenja treba dodati ranije skupljenom urinu. Nakon skupljanja izlučina iz metaboličkih kaveza u vrijeme planiranog usmrćenja, kaveze i posude za skupljanje treba oprati odgovarajućim otapalom. I drugu potencijalno kontaminiranu opremu isto tako treba analizirati.

1.4.10. **Analiza**

U svim studijama treba postići određenu razinu rekuperacije (tj. srednju vrijednost radioaktivnosti od 100 ± 10 %). Za rekuperaciju izvan tog područja treba navesti razlog. Količinu primijenjene doze u svakom uzorku treba analizirati postupcima koji su vrednovani na odgovarajući način.

U statističke podatke treba uključiti stupanj odstupanja ponovljenih pokusa kod svake primjene.

2. **PODACI**

Sljedeća mjerenja treba provesti za svaku životinju, kod svakog uzorkovanja ispitne kemikalije i/ili metabolita. Uz pojedinačne podatke, u izvješće treba unijeti i podatke grupirane prema vremenskim točkama uzorkovanja, kao srednje vrijednosti.

— količina koja se povezuje sa zaštitnim sredstvima,

— količina koju je moguće ukloniti s kože,

— količina u/na koži koju nije moguće isprati s kože,

▼B

— količina u uzorkovanoj krvi,

— količina u izlučevini i izdahnutom zraku (prema potrebi),

— količina preostala u truplu i organima odstranjenim za zasebnu analizu.

Količina ispitivane tvari i/ili metabolita u izlučevinama, izdahnutom zraku i truplu omogućuje određivanje ukupne količine koja je apsorbirana u svakoj točki vremena. Može se doći i do izračuna količine ispitivane tvari apsorbirane po cm^2 kože izložene ispitivanoj tvari tijekom razdoblja izlaganja.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati uvjete navedene u protokolu, uključujući dokaze o opravdanosti primijenjenog ispitnog sustava, kao i sljedeće informacije:

ispitivana tvar:

— identifikacijski podaci (npr. CAS broj, ako je poznat, izvor, čistoća (radiološko-kemijska čistoća), poznate nečistoće, broj partije),

— fizikalna priroda, fizikalno-kemijska svojstva (npr. pH, hlaplji-vost, topljivost, stabilnost, molekulska težina i log P_{ow}).

Ispitni pripravak:

— formulacija i opravdanost upotrebe,

— pojedinosti o ispitnom pripravku, primijenjenoj količini, postignutoj koncentraciji, nosaču, stabilnosti i homogenosti.

Pokusna životinja:

— upotrijebljena vrsta/soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku pokusa.

Uvjeti ispitivanja:

— pojedinosti o primjeni ispitnog pripravka (mjesto primjene, ispitne metode, okluzija/bez okluzije, volumen, ekstrakcija, detekcija),

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode.

Rezultati:

— eventualni znaci toksičnosti,

— tablični prikaz podataka o apsorpciji (podaci izraženi kao brzina, količina ili postotak),

▼B

— sveukupna rekuperacija na razini pokusa,

— tumačenje rezultata, usporedba sa svim dostupnim podacima o perkutanoj apsorpciji ispitivanog spoja.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No 20.

(4) Zendzian R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), str. 829-835.

(5) Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

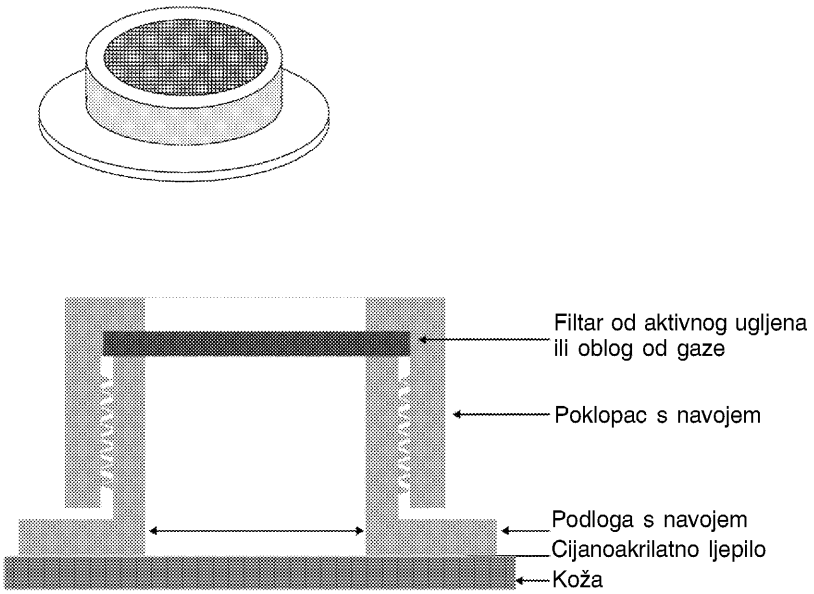
(8) Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, str. 369-373.

(9) Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, str. 399-404.

▼B

Slika 1.

Primjer konstrukcije tipičnog uređaja koji se koristi za omeđivanje i zaštitu mjesta dermalnog puta primjene tijekom studija perkutane apsorpcije *in vivo*



▼B

B.45. **APSORPCIJA PUTEM KOŽE: METODA *IN VITRO***

1. **METODA**

Ova je ispitna metoda ekvivalentna metodi iz Smjernice za ispitivanje OECD–a TG 428 (2004.).

1.1. UVOD

Ova je metoda razvijena s ciljem dobivanja informacija o apsorpciji ispitivane tvari primijenjene na isječak kože. Može se kombinirati s metodom apsorpcije putem kože: metodom *in vivo* (1), ili provoditi odvojeno. Kao pomoć kod planiranja studija koje se temelje na ovoj metodi preporuča se konzultirati smjernice OECD-a za provođenje studija apsorpcije putem kože (2). Smjernice su izrađene kako bi se olakšao odabir primjerenih postupaka *in vitro* u konkretnim okolnostima i osigurala pouzdanost rezultata dobivenih ovom metodom.

Metode za mjerenje apsorpcije putem kože i difuzije dermalnim putem mogu se podijeliti u dvije kategorije: *in vivo i in vitro*. Metode *in vivo* za istraživanje apsorpcije putem kože daju farmakološko-kinetičke informacije kod velikog broja životinjskih vrsta i dobro su poznate. Metoda *in vivo* opisana je zasebno u drugoj ispitnoj metodi (1). Metode *in vitro* također se godinama koriste za mjerenje apsorpcije putem kože. Iako za metode *in vitro* obuhvaćene ovom ispitnom metodom nisu provedene formalne validacijske studije, stručnjaci OECD-a procijenili su 1999. da je količina vrednovanih podataka dovoljna za dokumentiranje metode *in vitro* (3). Dodatne pojedinosti koje podupiru takvu odluku, uključujući i značajan broj izravnih usporedbi metoda *in vivo* i *in vitro,* navedene su u Smjernicama (2). Postoji čitav niz monografija koje obrađuju tu temu i daju iscrpne podloge o primjeni metode *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Metodama *in vitro* mjeri se difuzija kemikalija u i kroz kožu u spremnik fluida i u njima se za mjerenje samo difuzije može rabiti neaktivna koža, a svježa, metabolički aktivna koža, za istodobno mjerenje difuzije i metabolizma kože. Ove su metode posebno našle primjenu kao metode probira za usporedbu kutane i perkutane dobave kemikalija iz različitih formulacija i mogu dati korisne modele za procjenu perkutane apsorpcije kod ljudi.

Metoda *in vitro* ne mora biti primjenljiva u svim situacijama i na sve klase kemikalija. Ispitna metoda *in vitro* može se primijeniti za inicijalno kvalitativno vrednovanje penetracije kroz kožu. U nekim slučajevima, možda će to trebati potvrditi podacima dobivenim metodom *in vivo*. Za dodatne pojedinosti o situacijama u kojima bi primjena metode *in vitro* bila odgovarajuća treba konzultirati smjernice (2). Dodatne iscrpne informacije koje mogu biti od pomoći kod donošenja odluke navedene su u (3).

U ovoj metodi navode se opća načela za mjerenje dermalne apsorpcije i difuzije ispitivane tvari na isječku kože. Za to se može upotrijebiti koža velikog broja vrsta sisavaca, uključujući i ljude. Svojstva permeabilnosti kože očuvana su i nakon ekscizije uzorka s tijela jer neaktivan *stratum corneum* predstavlja glavnu prepreku za difuziju; nikakav oblik aktivnog prijenosa kemikalija kroz kožu nije utvrđen. S druge strane, dokazano je da koža ima sposobnost metaboliziranja nekih kemikalija tijekom perkutane apsorpcije (6), čime se stvarna apsorbirana doza ne ograničava, iako to može utjecati na prirodna svojstva materijala koji ulazi u krvotok.

▼B

1.2. DEFINICIJE

Neapsorbirana doza: predstavlja količinu opranu s površine kože nakon izlaganja i eventualno prisutnu količinu na neokluzivnom oblogu te svaku količinu za koju se dokaže da je ishlapila iz kože tijekom izlaganja.

Apsorbirana doza (*in vitro*): masa ispitivane tvari koja u navedenom vremenu dopre do fluida- receptora ili sustavnog krvotoka.

Doza koja se može apsorbirati (*in vitro*): predstavlja dozu prisutnu na ili u koži nakon pranja.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Ispitivana tvar, koja može biti obilježena radioaktivnim izotopom, primjenjuje se na površinu uzorka kože koja odvaja dvije komore ćelije za difuziju. Kemikalija određeno vrijeme ostaje na koži pod određenim uvjetima te se zatim odstranjuje odgovarajućim postupkom čišćenja. Uzorci prihvatnog fluida uzimaju se u određenim vremenskim rokovima cijelo vrijeme trajanja pokusa i analiziraju se s obzirom na prisutnost ispitivane kemikalije i/ili njezinih metabolita.

Ako se upotrebljavaju metabolički aktivni sustavi, metabolite ispitivane kemikalije moguće je analizirati odgovarajućim metodama. Na završetku pokusa određuje se distribucija ispitivane kemikalije i količinski se određuju njezini metaboliti, prema potrebi.

Primjenom odgovarajućih uvjeta opisanih u ovoj metodi i smjernicama (2), apsorpcija ispitivane tvari u danom vremenu određuje se analizom prihvatnog fluida i tretirane kože. Ispitivanu tvar preostalu u koži treba smatrati apsorbiranom ako se ne može dokazati da je apsorpciju moguće odrediti samo iz vrijednosti u prihvatnom fluidu. Analiza drugih sastojaka (materijal ispran s kože i zadržan unutar slojeva kože) omogućuje vrednovanje dodatnih podataka, uključujući točno određivanje razmještaja ukupne ispitivane tvari i postotka rekuperacije.

Kako bi se dokazala učinkovitost i pouzdanost ispitnog sustava u laboratoriju koji provodi ovaj pokus trebaju biti dostupni rezultati za relevantne referentne kemikalije koji moraju biti u skladu s literaturom objavljenom za primijenjenu metodu. Taj je uvjet moguće zadovoljiti na način da se odgovarajuća referentna tvar (za čiju je lipofilnost poželjno da bude slična lipofilnosti ispitivane tvari) ispituje istodobno s ispitivanom tvari ili da se navedu odgovarajući povijesni podaci za izvjestan broj referentnih tvari različite lipofilnosti (npr. kafein, benzojeva kiselina i testosteron).

1.4. OPIS ISPITNE METODE

1.4.1. **Difuzijska ćelija**

Difuzijska ćelija sastoji se od donorske komore i receptorske komore između kojih se postavlja koža (primjer tipične konstrukcije prikazan je na slici 1.). Ćelija ima više zadaća: treba osigurati da koža bude dobro zabrtvljena po rubovima, treba omogućiti jednostavno uzorkovanje i dobro miješanje otopine koja je u dodiru s donjom stranom kože te dobru regulaciju temperature ćelije i njezinog sadržaja. Prihvatljive su i statičke i protočne difuzijske ćelije. Obično se donorske komore tijekom izlaganja konačnoj dozi ispitnog pripravka ostavljaju nepokrivene. Međutim kod beskonačnih primjena i određenih scenarija za konačne doze, donorske komore mogu se pokriti.

▼B

1.4.2. **Receptorski fluid**

Poželjno je upotrijebiti fiziološki provodljiv prihvatni fluid iako se i drugi mogu koristiti pod uvjetom da se dokaže opravdanost njihove primjene. Sastav prihvatnog fluida treba precizno navesti. Treba dokazati odgovarajuću topljivost ispitivane tvari u prihvatnom fluidu kako ne bi predstavljao prepreku za apsorpciju. Osim toga, prihvatni fluid ne smije utjecati na integritet pripravka kože. U protočnom sustavu, brzina protoka ne smije biti prepreka difuziji ispitivane tvari u prihvatni fluid. U sustavu statične ćelije, fluid stalno treba miješati i redovito uzorkovati. Ako se proučava metabolizam, prihvatni fluid mora podržavati aktivnost kože tijekom cijelog pokusa.

1.4.3. **Pripravci kože**

Može se koristiti koža ljudskog ili životinjskog porijekla. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etničkim pitanjima i uvjetima. Iako je poželjna aktivna koža, može se upotrijebiti i neaktivna, pod uvjetom da se integritet kože može dokazati. Prihvatljive su obje epidermalne membrane (odvojene enzimski, toplinski ili kemijski) ili određeni slojevi kože (debljine obično 200-400 μm) pripremljeni pomoću dermatoma. Može se koristiti koža pune debljine, ali prekomjernu debljinu (približno > 1 mm) treba izbjegavati, osim ako se to posebno zahtijeva za određivanje ispitivane kemikalije po slojevima kože. Opravdanost odabira vrste, anatomskog mjesta i tehnike pripravljanja treba dokazati. Potrebno je pokus ponoviti najmanje četiri puta za svaki ispitni pripravak.

1.4.4. **Integritet pripravka kože**

Pravilna je priprema kože od presudne važnosti. Neodgovarajuće rukovanje može rezultirati oštećenjem sloja *stratum corneum*, pa je zato provjera integriteta pripravka neophodna. Ako se istražuje metabolizam kože, svježi isječak kože treba što je moguće brže upotrijebiti, i to pod uvjetima za koje je poznato da podržavaju metaboličku aktivnost. Općenito se smatra da svježi isječak kože treba upotrijebiti u roku 24 sata, ali prihvatljivo vrijeme skladištenja može varirati u zavisnosti o kojem se enzimskom sustavu u metabolizmu radi i o temperaturama skladištenja (13). Ako su pripravci kože prije upotrebe bili uskladišteni, treba podastrijeti dokaze da je funkcija zaštite sačuvana.

1.4.5. **Ispitivana tvar**

Ispitivana tvar je proizvod čije se karakteristike penetracije proučavaju. U idealnom slučaju, ispitivana tvar treba biti obilježena radioaktivnim izotopom.

1.4.6. **Ispitni pripravak**

Pripravak ispitivane tvari (npr. čisti, razrijeđeni ili formulirani materijal koji sadrži ispitivanu tvar koja se primjenjuje na kožu) treba biti isti (ili predstavljati realističan surogat) kao i pripravak kojem bi mogli biti izloženi ljudi ili druge potencijalne ciljne vrste. Opravdanost svakog odstupanja od pripravka koji se obično rabi treba dokazati.

▼B

1.4.7. **Koncentracije i formulacije ispitivanih tvari**

Obično se ispitivana tvar primjenjuje u nekoliko koncentracija koje obuhvaćaju gornje vrijednosti potencijalnog izlaganja ljudi. Isto tako, studija se može proširiti na cijeli niz tipičnih formulacija.

1.4.8. **Primjena na kožu**

U redovnim uvjetima u kojima su ljudi izloženi kemikalijama, obično se sreću konačne doze. Stoga treba upotrijebiti primjenu koja oponaša izlaganje ljudi, obično 1-5 mg/cm^2 kože za krutu tvar i do 10 $\mu l/cm^2$ za tekućine. Količinu treba opravdati očekivanim uvjetima upotrebe ili fizikalnim karakteristikama ispitnog pripravka. Na primjer, primjene na površinu kože mogu biti beskonačne ako se primjenjuju veliki volumeni po jedinici površine.

1.4.9. **Temperatura**

Pasivna difuzija kemikalija (pa stoga i apsorpcija putem kože) pod utjecajem je temperature. Komoru za difuziju i kožu treba održavati na stalnoj temperaturi bliskoj temperaturi normalne kože od 32 ± 1 °C. Za različite konstrukcije ćelija bit će potrebne različite temperature vodene kupke ili zagrijanog bloka, kako bi se osiguralo da prihvatna komora/koža budu u razini fiziološke norme. Poželjno je da vlažnost bude između 30 i 70 %.

1.4.10. **Trajanje izlaganja i uzrokovanje**

Koža se može ispitnom pripravku izlagati cijelo vrijeme trajanja pokusa ili u kraćim rokovima (tj. treba oponašati posebnu vrstu izlaganja kojem su podvrgnuti ljudi). S kože treba isprati višak ispitivane tvari odgovarajućim sredstvom za čišćenje, a ispranu tekućinu sakupiti za analizu. Postupak uklanjanja ispitnog pripravka ovisit će o očekivanom uvjetu upotrebe i njegovu opravdanost treba dokazati. Za odgovarajuću karakterizaciju profila apsorpcije obično je potrebno razdoblje uzorkovanja od 24 sata. Budući da se po isteku tih 24 sata integritet kože može početi pogoršavati, uzorkovanje treba provesti unutar 24 sata. Za tvari koje brzo prodiru u kožu to možda neće biti potrebno, ali za ispitivane tvari koje prodiru polagano, možda će trebati duže vrijeme. Učestalo uzimanje uzorka prihvatnog fluida treba omogućiti izradu grafičkog prikaza profila apsorpcije ispitivane tvari.

1.4.11. **Zaključni postupci**

Sve sastavne dijelove ispitnog sustava treba analizirati i odrediti razinu rekuperacije. Sustav obuhvaća donorsku komoru, ispiranje površine kože, pripravak kože i prihvatni fluid/komoru. U nekim slučajevima, koža se može frakcionirati na površinu kože koja se izlaže i površinu kože ispod ruba ćelije te na sloj *stratum corneum*, epidermu i dermu, za zasebnu analizu.

1.4.12. **Analiza**

U svim studijama treba postići odgovarajuću razinu rekuperacije (cilj bi trebao biti srednja vrijednost od 100 ± 10 % radioaktivnosti, a svako odstupanje od toga treba opravdati). Količinu ispitivane tvari u prihvatnom fluidu, pripravku kože, sredstvu s kojim se ispire površina kože i uređaj treba analizirati odgovarajućom tehnikom.

▼B

2. **PODACI**

Treba predočiti analizu prihvatnog fluida, distribuciju ispitivane kemikalije u ispitnom sustavu i profil apsorpcije s obzirom na vrijeme. Ako se primjenjuju uvjeti izlaganja s konačnom dozom, treba izračunati količinu ispranu s kože, količinu u koži (i različitim slojevima kože, ako se analiziraju), te količinu prisutnu u prihvatnom fluidu (stopa i količina ili postotak primijenjene doze). Apsorpcija putem kože se ponekad može izraziti samo pomoću podataka o prihvatnom fluidu. Međutim, ako na kraju studije ispitivana tvar ostaje u koži, možda će je trebati uključiti u ukupnu apsorbiranu količinu (vidjeti stavak 66. u referenci (3)). Ako se primjenjuju uvjeti izlaganja s beskonačnom dozom, podaci mogu omogućiti izračun konstante permeabilnosti (Kp). Pod uvjetima izlaganja s beskonačnom dozom, apsorbirani postotak nije relevantan.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju moraju biti navedeni uvjeti propisani u protokolu, uključujući dokaz o opravdanosti primijenjenog ispitnog sustava, kao i sljedeće informacije:

ispitivana tvar:

— fizikalna priroda, fizikalno-kemijska svojstva (najmanje molekulska težina i log P_{ow}), čistoća (radio-kemijska čistoća),

— identifikacijski podaci (npr. broj partije),

— topljivost u prihvatnom fluidu.

Ispitni pripravak:

— formulacija i opravdanost upotrebe,

— homogenost.

Uvjeti ispitivanja:

— podrijetlo i mjesto uzimanja kože, metoda izrade pripravka, uvjeti skladištenja prije uporabe, eventualna obrada prije tretiranja (čišćenje, tretiranje antibioticima itd.), mjerenje integriteta kože, metabolički status, opravdanost upotrebe,

— konstrukcija ćelije, sastav prihvatnog fluida, brzina protoka prihvatnog fluida ili vrijeme i postupci uzorkovanja,

— pojedinosti o primjeni ispitnog pripravka i kvantifikacija primijenjene doze,

— trajanje izlaganja,

— pojedinosti o uklanjanju ispitnog pripravka s kože, npr. ispiranje kože,

— pojedinosti analize kože i eventualnih tehnika frakcioniranja koje su primijenjene u dokazivanju distribucije u koži,

▼B

— postupci pranja ćelije i opreme,

— pokusne metode, tehnike ekstrakcije, granice detekcije i vrednovanje analitičke metode.

Rezultati:

— sveukupna rekuperacija na razini pokusa (primijenjena doza = ispiranje kože + koža + prihvatni fluid + ispiranje ćelije),

— tablični prikaz rekuperacije po pojedinačnim ćelijama u svakom odjeljku,

— profil apsorpcije,

— tablični prikaz podataka apsorpcije (podaci izraženi kao brzina, količina ili postotak).

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

4. **REFERENCE**

(1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In Vivo* Method.

(2) OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, str. 237-241.

(6) Bronaugh R.L. and Maibach H.I., (1991) *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W., (1999) Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, str. 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

(10) Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

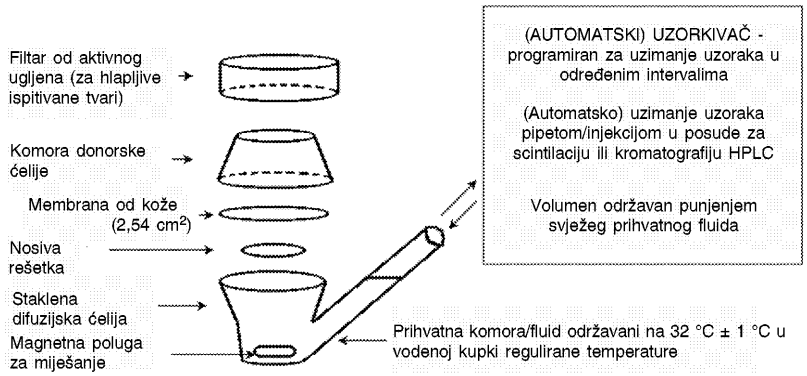
(11) Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, str. 356-365.

Slika 1.

Primjer tipične konstrukcije statičke difuzijske ćelije za studije perkutane apsorpcije *in vitro*



▼M8

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (2015.). Nadraživanje kože odnosi se na izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do četiri sata [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN)] (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]) Europske unije. Ovom se ispitnom metodom pruža *in vitro* postupak koji se može upotrebljavati za identificiranje opasnosti nadražujućih kemikalija (tvari i smjesa) u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a/CLP-a (2.). U regijama koje nisu donijele neobaveznu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) ova se ispitna metoda može upotrebljavati i za identifikaciju nerazvrstanih kemikalija. Ovisno o regulatornom okviru i sustavu razvrstavanja koji se upotrebljava, ova se ispitna metoda stoga može upotrebljavati kako bi se utvrdilo nadražuje li kemikalija kožu, kao samostalno zamjensko ispitivanje za *in vivo* ispitivanje nadraživanja kože ili kao djelomično zamjensko ispitivanje u okviru strategije ispitivanja (3.).

2. Procjena nadraživanja kože dosad je obično obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja [ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.] (4.). Za ispitivanje nagrizanja donesene su tri validirane ispitne metode *in vitro* – ispitna metoda EU-a B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430), ispitna metoda B.40.*bis* (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (5., 6. i 7.). U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (3.).

3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na *in vitro* ispitnom sustavu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE) koja vjerno oponaša biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. U ispitnom sustavu RhE ljudski netransformirani epidermalni keratinociti upotrebljavaju se kao izvor stanica za rekonstrukciju modela epiderme s reprezentativnom histologijom i citoarhitekturom. Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) kako bi se olakšala validacija i procjena sličnih i izmijenjenih ispitnih metoda koje se temelje na modelu RhE, u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (8. i 9.). Odgovarajuća smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2010. i ažurirana 2013. kako bi se uključili dodatni modeli RhE, a 2015. ažurirana je kako bi se uputilo na smjernice o IATA-i i uveo alternativni postupak za mjerenje vijabilnosti.

4. Za četiri komercijalno dostupna *in vitro* ispitna modela dovršene su predvalidacijske, optimizacijske i validacijske studije (10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23., 24., 25., 26., 27. i 28.) na temelju

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

▼**M8**

ispitnog sustava RhE (osjetljivost od 80 %, specifičnost od 70 % i točnost od 75 %). Ta četiri ispitna modela uključena su u ovu ispitnu metodu i navedena su u Dodatku 2., u kojem se navode i informacije o vrsti validacijske studije koja je upotrijebljena za validaciju odgovarajućih ispitnih metoda. Kako je navedeno u Dodatku 2., za razvoj ove ispitne metode i zahtjeva izvedbe upotrijebljena je validirana referentna metoda (VRM) (8.).

5. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo za ispitne modele koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe (8.) ako je OECD pregledao i donio te ispitne modele. Ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu i odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja iz ispitnih metoda *in vitro* za nadraživanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvaćanja podataka.

6. Definicije pojmova upotrijebljenih u ovom dokumentu navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

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

8. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nagrizanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.40.*bis* (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) za nagrizanje kože temelji na istom ispitnom sustavu RhE uz upotrebu drugog protokola (6.). Ova se ispitna metoda temelji na modelima RhE koristeći ljudske keratinocite koji stoga predstavljaju *in vitro* ciljni organ vrste koja se proučava. Pored toga neposredno uključuje početnu fazu upalne kaskade/mehanizma djelovanja (oštećenje stanica i tkiva koje dovodi do lokalizirane ozljede) koja se javlja tijekom nadraživanja *in vivo*. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, a bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno ukupno 58 kemikalija (16., 18. i 23.). Ispitna metoda primjenjiva je na krute tvari, tekućine, polukrute tvari i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji (29.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

9. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna

▼M8

metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012. (30.)), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Slično tome, trebalo bi o tome voditi računa ako se za određene kemijske razrede ili fizikalno-kemijska svojstva utvrdi da nisu primjenjivi na trenutačnu ispitnu metodu.

10. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti stanica te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke (vidjeti stavke 28.–34.).

11. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća tri ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti od 50 ± 5 %, trebalo bi razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.

13. Kemijski inducirano nadraživanje kože, koje se uglavnom očituje u pojavi eritema i edema, rezultat je kaskade događaja koja započinje prodiranjem kemikalija u rožnati sloj gdje mogu oštetiti niže slojeve keratinocita i druge stanice kože. Oštećene stanice mogu otpuštati upalne posrednike ili inducirati upalnu kaskadu koja djeluje i na stanice derme, a posebno stromalne i endotelne stanice krvnih žila. Zamijećeni eritemi i edemi (29.) posljedica su dilatacije i povećane propusnosti endotelnih stanica. Točnije, ako u *in vitro* ispitnom sustavu ne postoji nikakva vaskularizacija, metode na temelju rekonstruirane ljudske epiderme mjere početne događaje u kaskadi, npr. oštećenje stanica/tkiva (16. i 17.) upotrebom vijabilnosti stanica kao očitanja.

14. Vijabilnost stanica u modelima RhE mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (31.). Nadražujuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (tj. ≤ 50 % za 2. kategoriju UN GHS-a). Ovisno o regulatornom okviru i primjenjivosti ispitne metode, ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost stanica iznad definiranog praga mogu se smatrati tvarima koje ne nadražuju (tj. > 50 %, bez kategorije).

▼M8

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

15. Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiriju validiranih ispitnih modela koji su u skladu s ovom ispitnom metodom (Dodatak 2.) laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tablici 1. U slučajevima u kojima, na primjer, navedena tvar nije dostupna, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (8.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1. Upotrebu alternative tvari koja služi za dokazivanje osposobljenosti trebalo bi opravdati.

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

Tablica 1.

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti ([1])

Tvar	CAS br.	Rezultat ocjenjivanja *in vivo* ([2])	Agregatno stanje	Kategorija sustava UN GHS-a
NERAZVRSTANE TVARI (bez kategorije prema UN GHS-u)				
naftalenoctena kiselina	86-87-3	0	Kruto	Bez kat.
izopropanol	67-63-0	0,3	Tekuće	Bez kat.
metil-stearat	112-61-8	1	Kruto	Bez kat.
heptilbutirat	5870-93-9	1,7	Tekuće	Bez kat. (*Neobavezna 3. kat.*) ([3])
heksilsalicilat	6259-76-3	2	Tekuće	Bez kat. (*Neobavezna 3. kat.*) ([3])
RAZVRSTANE TVARI (2. kategorija sustava UN GHS-a)				
ciklamen-aldehid	103-95-7	2,3	Tekuće	2. kat.
1-bromheksan	111-25-1	2,7	Tekuće	2. kat.
kalijev hidroksid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Tekuće	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Kruto	2. kat.
heptanal	111-71-7	3,4	Tekuće	2. kat.

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

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

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

▼M8

POSTUPAK

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

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

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

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

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

Tablica 2.

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

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼M8

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funkcija barijere

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

Morfologija

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

Obnovljivost

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

Kontrola kvalitete (KK)

23. Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji *vijabilnost* (stavak 19.), *funkcija barijere* (stavak 20.) i *morfologija* (stavak 21.). Ti bi se podaci trebali dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvješće o ispitivanju. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC_{50} ili ET_{50} trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Za pouzdano predviđanje razvrstavanja nadražujućih učinaka prihvatljivi su isključivo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju zadane kriterije. Rasponi prihvatljivosti za četiri ispitna modela uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 3.

Tablica 3.

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

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

▼M8

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

24. Za svaku ispitivanu kemikaliju i za kontrole trebalo bi upotrijebiti najmanje tri ponovljena uzorka u svakom ciklusu. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti dozu od 26 do 83 $\mu l/cm^2$ ili mg/cm^2 (vidjeti Dodatak 3.). Kod kemikalija u krutom stanju površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kako bi se poboljšao kontakt između ispitivane kemikalije i površine epiderme. Kad je god moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. U određenim se slučajevima kao pomoć pri nanošenju može upotrijebiti najlonska mreža (vidjeti Dodatak 3.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo isprati s površine epiderme vodenom puferskom otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o ispitnom modelu RhE koji se upotrebljava, razdoblje izlaganja kreće se od 15 do 60 minuta, a temperatura inkubacije od 20 do 37 °C. Ta razdoblja izlaganja i temperature optimiziraju se za svaku pojedinačnu ispitnu metodu RhE i predstavljaju različita intrinzična svojstva ispitnih modela (npr. funkciju barijere) (vidjeti Dodatak 3.).

25. U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (upotrebom negativne kontrole), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (upotrebom pozitivne kontrole) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Predlaže se da se kao pozitivna kontrola koristi 5-postotna vodena otopina SDS. Predložene su negativne kontrole voda ili fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS).

Mjerenja vijabilnosti stanica

26. Prema ispitnom postupku od ključne je važnosti da se mjerenje vijabilnosti ne provodi neposredno nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji, već nakon dovoljno dugog razdoblja inkubacije nakon tretiranja tijekom koje se oprana tkiva drže u svježem mediju. Ova faza ostavlja dovoljno vremena da se tkivo oporavi od blagih citotoksičnih učinaka, ali i da se pojave jasni znakovi citotoksičnih učinaka. U fazi optimizacije testa dvaju ispitnih modela na temelju RhE na kojima se temelji ova ispitna metoda pokazalo se da optimalno razdoblje inkubacije nakon tretiranja iznosi 42 sata (11., 12., 13., 14. i 15.).

27. MTT test je standardizirana kvantitativna metoda koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. Uzorak tkiva stavi se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3–1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Vijabilne stanice pretvaraju MTT u plavi formazan. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana izmjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ±30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.).

28. Optička svojstva ispitivane kemikalije ili njezino kemijsko djelovanje na MTT (npr. kemikalije mogu spriječiti ili obrnuti proces nastajanja boje, ali ga i izazvati) mogu ometati test i dovesti do pogrešne procjene vijabilnosti. To se može dogoditi kad se određena ispitivana kemikalija ne spere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu. Ako ispitivana kemikalija izravno djeluje na MTT (npr. redukcijom MTT-a), prirodno je obojena ili se oboji tijekom tretiranja tkiva, treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila

▼M8

i ispravila interferencija ispitivane kemikalije s mjernom tehnikom koja se koristi za mjerenje vijabilnosti (vidjeti stavke 29. i 33.) Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za četiri validirana modela uključena u ovu ispitnu metodu (32., 33., 34. i 35.).

29. Kako bi se identificirale kemikalije koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih tkiva RhE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao vijabilna tkiva. Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se dobila nespecifična redukcija MTT-a (NSMTT) (32., 33., 34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).

30. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje kad dođu u dodir s vodom ili izopropanolom i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrahiranje). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 33. i 34.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno s ispitivanjem obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih s otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{living}).

31. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 29.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 30.) pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje interferiraju s MTT

▼M8

testom (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 29. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i $\%NSC_{living}$ te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja ($\%NSC_{killed}$).

32. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ekstrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljeni postotak vijabilnosti dobiven ispitivanom kemikalijom već $\leq$ 50 %. Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili $\%NSC_{living} \geq 50$ % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to granična vrijednost koja se upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 36.).

33. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 29.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji

▼M8

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

34. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 37.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 4., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

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

Tumačenje rezultata i model predviđanja

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

▼M8

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

— ovisno o regulatornom okviru zemalja članica, može se smatrati da ispitivana kemikalija nije nadražujuća za kožu u skladu s oznakom „bez kategorije” UN GHS-a ili CLP-a ako je vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja viša od (>) 50 %.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

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

Izvješće o ispitivanju

38. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

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

— tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolnih kemikalija prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

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

▼**M8**

Ispitni uvjeti:

— model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),

— informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja, opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,

— opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo, potpune popratne informacije o konkretnom modelu RhE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

i. vijabilnost;

ii. funkciju barijere;

iii. morfologiju;

iv. obnovljivost i prediktivnost;

v. kontrole kvalitete (KK) modela,

— upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,

— dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

— pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja), doza upotrijebljene ispitne kemikalije i kontrola,

— trajanje i temperatura izlaganja i razdoblja inkubacije nakon izlaganja,

— oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

— broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, ako je primjenjivo),

— opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,

— opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

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

▼M8

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka za pojedinačnu ispitivanu kemikaliju, za svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva i standardnu devijaciju,

— ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standardnu devijaciju te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,

— rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,

— opis drugih uočenih učinaka,

— utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2. EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. travnja 2009. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.

3. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

4. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.

5. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).

6. Poglavlje B.40.*bis* ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).

7. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.

▼**M8**

8. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

9. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57.–93.

11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765.–770.

12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107.–114.

13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351.–367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329.–349.

15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109.–129.

16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559.–601.

17. Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

18. Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603.–619.

19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351.–358.

▼**M8**

20. EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. travnja 2007. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

21. EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Napomena: ovo su izvorni zahtjevi izvedbe korišteni za validaciju dviju ispitnih metoda. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.).*

22. EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. studenoga 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

23. OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

24. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327.–334.

25. Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111.–122.

26. OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

27. OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

28. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33.–50.

29. Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231.–243.

30. Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393.–403.

31. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.

▼**M8**

32. EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.

33. EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

34. SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

35. LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24".

36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Rukopis u pripremi.

37. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

38. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, u: Practical Contact Dermatitis, str. 7.–18. (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

39. EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Napomena: ovo je trenutačna verzija ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe, ažuriranih 2009. s obzirom na provedbu UN GHS-a. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.) koja se odnosi na ovu smjernicu za ispitivanje.*

40. EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. srpnja 2009.

41. EK (2001.) Direktiva Komisije 2001/59/EZ od 6. kolovoza 2001. o dvadeset osmoj prilagodbi tehničkom napretku Direktive Vijeća 67/548/EEZ o usklađivanju zakona i drugih propisa u odnosu na razvrstavanje, pakiranje i označivanje opasnih tvari, *Službeni list Europske unije* L225, 1.–333.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

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

Kemikalija: znači tvar ili smjesa.

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

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

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

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

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

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

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

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

▼M8

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

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

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC_{living}: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

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

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

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

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

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

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

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

▼**M8**

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

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

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

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

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

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

▼M8

Dodatak 2.

ISPITNI MODELI UKLJUČENI U OVU ISPITNU METODU

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

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

SIT: ispitivanje nadraživanja kože

RHE: rekonstruirana ljudska epiderma

▼**M8**

Dodatak 3.

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

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

	EpiSkin™ (standardna metoda)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Predinkubacija				
Vrijeme inkubacije	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Volumen medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ili 1 ml	0,5 ml
B) Primjena ispitivane kemikalije				
Za tekućine	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Za krute tvari	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Upotreba najlonske mreže	Ne upotrebljava se	Prema potrebi	Primijenjena	Ne upotrebljava se
Ukupno vrijeme primjene	15 minuta	60 minuta	42 minute	15 minuta
Temperatura primjene	ST	a) na sobnoj temperaturi 25 minuta b) na 37 °C 35 minuta	ST	ST
C) Volumen nakon inkubacije				
Volumen medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Najveća prihvatljiva varijabilnost				
Standardna devijacija između ponovljenih uzoraka tkiva	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

ST: sobna temperatura
DV: destilirana voda
DPBS: Dulbeccova fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

▼**M8**

Dodatak 4.

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

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

([1]) LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 μg/ml.;

▼M7

B.47. METODA ISPITIVANJA ZAMUĆENJA I PROPUSNOSTI GOVEĐE ROŽNICE ZA UTVRĐIVANJE I. KEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I II. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 437 (2013.). Metodu ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice (BCOP) ocijenio je Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) u suradnji s Europskim centrom za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) i Japanskim centrom za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM) 2006. i 2010. (1. i 2.). Tijekom prvog ocjenjivanja BCOP ispitne metode ocjenjivala se njezina korisnost pri utvrđivanju kemikalija (tvari i smjesa) koje izazivaju tešku ozljedu oka (1.). Tijekom drugog ocjenjivanja BCOP ispitne metode ocjenjivala se njezina korisnost pri utvrđivanju kemikalija (tvari i smjesa) koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (2.) Validacijska baza podataka za validaciju sadržavala je ukupno 113 tvari i 100 smjesa (2. i 3.). Na temelju tih ocjenjivanja i njihova stručnog preispitivanja zaključeno je da se ispitnom metodom mogu točno utvrditi kemikalije (tvari i smjese) koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1.) i one koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (4.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]), te je ona stoga odobrena kao znanstveno valjana u obje svrhe. Teška ozljeda oka znači oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka koji nisu potpuno reverzibilni u roku od 21 dana nakon primjene. Ispitivane kemikalije koje izazivaju tešku ozljedu oka razvrstane su u kategoriju 1. sustava UN GHS. Kemikalije koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka definirane su kao one koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS, odnosno one se navode kao kemikalije bez kategorije prema sustavu UN GHS. Ova ispitna metoda uključuje preporučenu uporabu i ograničenja BCOP ispitne metode na temelju njezinih ocjenjivanja. Glavne razlike između izvorne verzije Smjernice OECD-a za ispitivanje iz 2009. i ažurirane verzije iz 2013. odnose se, među ostalim, na: uporabu BCOP ispitne metode za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati u skladu sa sustavom UN GHS (stavci 2. i 7.), pojašnjenja primjene BCOP ispitne metode na ispitivanje alkohola, ketona i krutih tvari (stavci 6. i 7.) te tvari i smjesa (stavak 8.), pojašnjenja kako bi trebalo ispitivati površinski aktivne tvari i smjese koje sadržavaju površinski aktivne tvari (stavak 28.), ažuriranja i pojašnjenja povezana s pozitivnim kontrolama (stavci 39. i 40), ažuriranje kriterija za donošenje odluke o BCOP ispitnoj metodi (stavak 47.), ažuriranje kriterija prihvatljivosti istraživanja (stavak 48.), ažuriranje elemenata izvješća o ispitivanju (stavak 49.), ažuriranje Dodatka 1. o definicijama, dodavanje Dodatka 2. o prediktivnoj sposobnosti BCOP ispitne metode u okviru različitih sustava razvrstavanja, ažuriranje Dodatka 3. o popisu kemikalija za ispitivanje osposobljenosti i ažuriranje Dodatka 4. o držaču rožnice za ispitivanje BCOP-a (stavak 1.) i o opacimetru (stavci 2. i 3.).

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

▼M7

Trenutačno je opće prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku neće moći zamijeniti nijednim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem nadraživanja oka za predviđanje punog raspona nadraživanja za različite kemijske razrede. Međutim, kao zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja (5.). Pristup odozgo prema dolje (5.) trebalo bi primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će kemikalija imati veliki potencijal za nadražujuće djelovanje, dok bi se pristup odozdo prema gore (5.) trebao primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će nadraživanje oka koje prouzroči kemikalija biti takvo da će kemikaliju biti potrebno razvrstati. BCOP ispitna metoda je *in vitro* ispitna metoda koja se u određenim okolnostima i uz posebna ograničenja može primjenjivati za razvrstavanje i označivanje kemikalija prema opasnosti. Iako se ne smatra valjanom kao samostalna zamjena za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, BCOP ispitna metoda preporučuje se kao početni korak u okviru ispitne strategije kao što je pristup odozgo prema dolje koji predlažu Scott *et al.* (5.) za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka, odnosno kemikalija koje treba razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS bez daljnjeg ispitivanja (4.). BCOP ispitna metoda preporučuje se i za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, kako je utvrđeno sustavom UN GHS (bez kategorije prema sustavu UN GHS (4.) u okviru ispitne strategije kao što je pristup odozdo prema gore (5.) Međutim, za kemikaliju za koju nije predviđeno da će uzrokovati tešku ozljedu oka ili da će biti nerazvrstana s obzirom na nadraživanje oka / tešku ozljedu oka na temelju BCOP ispitne metode bit će potrebno dodatno ispitivanje (*in vitro* i/ili *in vivo*) za utvrđivanje konačnog razvrstavanja.

Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko mjerenog njezinom sposobnošću izazivanja zamućenja i povećane propusnosti izolirane goveđe rožnice. Toksični učinci na rožnicu mjere se: i. smanjenim prijenosom svjetlosti (zamućenjem) i ii. povećanim prolazom boje natrijevog fluoresceina (propusnošću). Ocjene zamućenja i propusnosti rožnice nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji kombiniraju se kako bi se dobila *in vitro* vrijednost nadražujućeg djelovanja (IVIS), koja se upotrebljava za razvrstavanje ispitivane kemikalije prema razini nadražujućeg djelovanja.

Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ova se ispitna metoda temelji na protokolu ICCVAM-a za BCOP ispitnu metodu (6. i 7.), koji je izvorno razvijen na temelju informacija dobivenih iz protokola Instituta za *in vitro* znanosti (IIVS) i protokola INVITTOX 124. (8.). Potonji protokol primjenjivao se u predvalidacijskom istraživanju koje je naručila Europska zajednica i koje je provedeno 1997. i 1998. Oba su se protokola temeljila na BCOP ispitnoj metodi o kojoj su prvi izvijestili Gautheron *et al*. (9.).

BCOP ispitna metoda može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka kako je utvrđeno sustavom UN GHS, odnosno kemikalija koje treba razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS (4.). Kada se primjenjuje u tu svrhu, BCOP ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 79 % (150/191), stopu lažno pozitivnih rezultata od 25 % (32/126) i stopu lažno negativnih rezultata od 14 % (9/65) u odnosu na podatke dobivene metodom *in vivo* ispitivanja na oku kunića razvrstane u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS (3.) (vidjeti tablicu 1. u Dodatku 2.). Ako se iz baze podataka isključe ispitivane kemikalije iz određenih kemijskih (tj. alkoholi, ketoni) ili fizikalnih (tj. krute tvari) kategorija, BCOP ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 85 % (111/131), stopu

▼M7

lažno pozitivnih rezultata od 20 % (16/81) i stopu lažno negativnih rezultata od 8 % (4/50) u sustavu razvrstavanja UN GHS (3.). Mogući nedostaci BCOP ispitne metode kada se primjenjuje za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS) temelje se na visokim stopama lažno pozitivnih rezultata za alkohole i ketone i visokoj stopi lažno negativnih rezultata za krute tvari zapaženih u validacijskoj bazi podataka (1., 2. i 3.). Međutim, budući da BCOP ispitnom metodom nisu precijenjeni rezultati za sve alkohole i ketone i budući da je za određene alkohole i ketone točno predviđena kategorija 1. sustava UN GHS, ne smatra se da su te dvije organske funkcionalne skupine izvan područja primjene ispitne metode. Na korisniku je ove ispitne metode da odluči o tome mogu li se prihvatiti mogući precijenjeni rezultati u pogledu određenog alkohola ili ketona ili bi trebalo provesti dodatno ispitivanje uz primjenu pristupa koji se temelji na ocjenjivanju snage dokaza. U pogledu stopa lažno negativnih rezultata za krute tvari, trebalo bi napomenuti da krute tvari mogu dovesti do promjenjivih i ekstremnih uvjeta izlaganja u *in vivo* Draizeovom ispitivanju nadraživanja oka, što za posljedicu može imati nevažna predviđanja u pogledu njihova stvarnog potencijala za nadražujuće djelovanje (10.). Jednako bi tako trebalo napomenuti da, u kontekstu utvrđivanja kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS), nijedan lažno negativan rezultat utvrđen u validacijskoj bazi podataka ICCVAM-a (2. i 3.) nije za posljedicu imao IVIS ≤ 3, što je kriterij koji se primjenjuje kako bi se utvrdilo da je ispitivana kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS. Nadalje, lažno negativni rezultati prema BCOP-u u tom kontekstu nisu kritični jer će se sve ispitivane kemikalije s rezultatom 3 < IVIS ≤ 55 naknadno ispitati drugim *in vitro* ispitivanjima potvrđenima na odgovarajući način ili, kao krajnja opcija, na kunićima, ovisno o regulatornim zahtjevima, uz primjenu strategije naknadnog ispitivanja i pristupa koji se temelji na ocjenjivanju snage dokaza. S obzirom na činjenicu da je BCOP ispitnom metodom točno predviđeno da određene krute kemikalije pripadaju kategoriji 1. sustava UN GHS, jednako se tako ne smatra da je to agregatno stanje izvan područja primjene ispitne metode. Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode za sve vrste kemikalija, pri čemu bi IVIS > 55 trebalo prihvatiti kao pokazatelj odgovora da kemikalija izaziva tešku ozljedu oka i da bi je bez daljnjeg ispitivanja trebalo razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS. Međutim, kako je već navedeno, pozitivne rezultate dobivene s alkoholima ili ketonima trebalo bi oprezno tumačiti zbog potencijalno precijenjenih rezultata.

BCOP ispitna metoda može se primjenjivati i za utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS (4.). Kada se primjenjuje u tu svrhu, BCOP ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 69 % (135/196), stopu lažno pozitivnih rezultata od 69 % (61/89) i stopu lažno negativnih rezultata od 0 % (0/107) u odnosu na podatke dobivene metodom *in vivo* ispitivanja na oku kunića razvrstane u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS (3.) (vidjeti tablicu 2. u Dodatku 2.). Dobivena stopa lažno pozitivnih rezultata (*in vivo* kemikalije bez kategorije prema sustavu UN GHS koje imaju IVIS > 3, vidjeti stavak 47.) prilično je visoka, ali nije kritična u tom kontekstu jer će se sve ispitivane kemikalije s rezultatom 3 < IVIS ≤ 55 naknadno ispitati drugim *in vitro* ispitivanjima potvrđenima na odgovarajući način ili, kao krajnja opcija, na kunićima, ovisno o regulatornim zahtjevima, uz primjenu strategije sekvencijskog ispitivanja u okviru pristupa koji se temelji na ocjenjivanju snage dokaza. U BCOP ispitnoj metodi nisu zapaženi posebni nedostaci u pogledu ispitivanja alkohola, ketona i krutih tvari kada je cilj utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS) (3.). Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode za sve vrste kemikalija, pri čemu bi negativan rezultat (IVIS ≤ 3) trebalo prihvatiti kao pokazatelj da nije potrebno razvrstavanje (bez kategorije prema sustavu UN GHS). Budući da se BCOP ispitnom metodom može točno utvrditi samo 31 % kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, ova ispitna metoda ne bi trebala biti prvi izbor za pokretanje pristupa odozdo prema gore (5.) ako su na raspolaganju druge potvrđene i prihvaćene *in vitro* metode sa sličnom osjetljivošću, ali većom specifičnošću.

▼M7

Validacijska baza podataka za validaciju sadržavala je ukupno 113 tvari i 100 smjesa (2. i 3.). Stoga se smatra da je BCOP ispitna metoda primjenjiva za ispitivanje i tvari i smjesa.

BCOP ispitna metoda ne preporučuje se za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje bi trebalo razvrstati kao kemikalije koje nadražuju oči (kategorija 2. ili kategorija 2.A sustava UN GHS) ili ispitivanih kemikalija koje bi trebalo razvrstati kao kemikalije koje blago nadražuju oči (kategorija 2.B sustava UN GHS) zbog znatnog broja kemikalija iz kategorije 1. sustava UN GHS koje su razvrstane u nedovoljno visoke kategorije 2., 2.A ili 2.B sustava UN GHS te zbog kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS koje su razvrstane u previsoke kategorije 2., 2.A ili 2.B sustava UN GHS (2. i 3.). U tu svrhu može biti potrebno daljnje ispitivanje drugom prikladnom metodom.

Svi postupci s goveđim očima i goveđim rožnicama trebali bi biti u skladu s primjenjivim propisima ustanove koja provodi ispitivanje i postupcima za rukovanje materijalom dobivenim od životinja, koji među ostalim uključuje tkiva i tkivne tekućine. Preporučuju se općenite mjere opreza za laboratorije (11.).

Iako se u okviru BCOP ispitne metode ne razmatraju ozljede konjunktive i šarenice, razmatraju se učinci na rožnicu, koji su glavni pokretač *in vivo* razvrstavanja kad je riječ o razvrstavanju u skladu sa sustavom UN GHS. Reverzibilnost lezija rožnice ne može se sama po sebi ocijeniti BCOP ispitnom metodom. Na temelju istraživanja na oku kunića predloženo je da se za utvrđivanje određenih vrsta ireverzibilnih učinaka može primjenjivati ocjena početne dubine ozljede rožnice (12.). Međutim, potrebne su daljnje znanstvene spoznaje kako bi se razumjelo kako nastaju ireverzibilni učinci koji nisu povezani s početnom ozljedom visoke razine. Naposljetku, BCOP ispitnom metodom ne omogućuje se ocjena potencijala za sustavnu toksičnost povezanu s izlaganjem oka.

Ovu će se ispitnu metodu povremeno ažurirati uzimajući u obzir nove informacije i podatke. Na primjer, histopatologija može biti korisna ako je potreban potpuniji opis oštećenja rožnice. Kako je istaknuto u Smjernici OECD-a br. 160 (13.), korisnike se potiče da konzerviraju rožnice i pripreme histopatološke uzorke koji se mogu upotrijebiti za izradu baze podataka i kriterija za donošenje odluka kojima se može dodatno poboljšati točnost ove ispitne metode.

Svaki laboratorij koji je započeo s uspostavljanjem ove ispitne metode trebao bi upotrebljavati kemikalije za ispitivanje osposobljenosti navedene u Dodatku 3. Laboratorij može upotrebljavati te kemikalije kako bi dokazao svoju tehničku osposobljenost za provedbu BCOP ispitne metode prije dostave podataka o BCOP ispitnoj metodi u svrhu regulatornog razvrstavanja prema opasnosti.

NAČELO ISPITIVANJA

BCOP ispitna metoda organotipski je model kojim se osigurava kratkotrajno održavanje normalne fiziološke i biokemijske funkcije goveđe rožnice *in vitro*. U ovoj ispitnoj metodi oštećenje uzrokovano ispitivanom kemikalijom ocjenjuje se kvantitativnim mjerenjima promjena zamućenja i propusnosti rožnice opacimetrom odnosno spektrofotometrom vidljive svjetlosti. Oba mjerenja primjenjuju se za izračun IVIS-a, koji se upotrebljava kako bi se *in vitro* utvrđena kategorija razvrstavanja prema opasnosti nadraživanja mogla iskoristiti za *in vivo* procjenu potencijala neke ispitivane kemikalije da nadraži oko (vidjeti kriterije za donošenje odluke u stavku 48.).

U BCOP ispitnoj metodi upotrebljavaju se izolirane rožnice iz očiju svježe zaklane stoke. Zamućenje rožnice mjeri se kvantitativno kao količina prijenosa svjetlosti kroz rožnicu. Propusnost se mjeri kvantitativno kao količina boje natrijeva fluorescein koja prolazi punom debljinom rožnice, kako je detektirana u mediju u stražnjoj komori. Ispitivane kemikalije nanose se na epitelnu površinu

▼M7

rožnice dodavanjem u prednju komoru držača rožnice. Dodatak 4. sadržava opis i dijagram držača rožnice koji se upotrebljava u BCOP ispitnoj metodi. Držači rožnice mogu se komercijalno nabaviti iz različitih izvora ili se mogu izraditi.

Izvor i starost goveđih očiju i odabir životinjskih vrsta

Stoka koja se šalje u klaonicu obično se kolje za ljudsku potrošnju ili za druge komercijalne namjene. Samo zdrave životinje koje se smatraju prikladnima za uvrštavanje u lanac ljudske prehrane upotrebljavaju se kao izvor rožnica za uporabu u BCOP ispitnoj metodi. Budući da tjelesna masa stoke u velikoj mjeri varira ovisno o pasmini, dobi i spolu, ne postoji preporučena tjelesna masa životinje u vrijeme klanja.

Kada se upotrebljavaju oči životinja različite dobi, može doći do varijacija u dimenzijama rožnica. Rožnice horizontalnog promjera > 30,5 mm i vrijednosti debljine srednjeg dijela rožnice (CCT) ≥ 1 100 μm obično se dobivaju od stoke starije od osam godina, dok se rožnice horizontalnog promjera < 28,5 mm i CCT-a < 900 μm obično dobivaju od stoke mlađe od pet godina (14.). Zbog toga se obično ne upotrebljavaju oči stoke starije od 60 mjeseci. Oči stoke mlađe od 12 mjeseci uglavnom se ne upotrebljavaju jer su one još u razvoju pa su debljina i promjer rožnice znatno manji nego kod očiju odrasle stoke. Međutim, uporaba rožnice mladih životinja (tj. životinja u dobi do šest do 12 mjeseci) dopuštena je jer ima određenih prednosti, kao što su veća dostupnost, uži dobni raspon i smanjena opasnost povezana s potencijalnim izlaganjem radnika goveđoj spongiformnoj encefalopatiji (15.). Budući da bi dodatno ocjenjivanje učinka veličine i debljine rožnice na osjetljivost na nagrizajuće i nadražujuće kemikalije bilo korisno, korisnike se potiče da za životinje od kojih se uzima rožnica koja se upotrebljava u istraživanju zabilježe procijenjenu dob i/ili tjelesnu masu.

Prikupljanje i prijevoz očiju u laboratorij

Oči prikupljaju radnici u klaonici. Kako bi se mehanička i druga oštećenja očiju svela na najmanju moguću mjeru, oči bi trebalo enukleirati što je to moguće prije nakon smrti životinje i odmah staviti na hlađenje nakon enukleacije i tijekom prijevoza. Kako bi se izbjeglo izlaganje očiju potencijalno nadražujućim kemikalijama, pri ispiranju glave životinje radnici u klaonici ne bi se trebali služiti deterdžentima.

Oči bi trebalo potpuno uroniti u Hankovu izbalansiranu slanu otopinu (HBSS) u spremniku prikladne veličine i prevesti do laboratorija tako da se propadanje i/ili bakteriološka kontaminacija svedu na najmanju moguću mjeru. Budući da se prikupljaju tijekom postupka klanja, oči mogu biti izložene krvi i drugim biološkim materijalima, uključujući bakterije i druge mikroorganizme. Stoga je važno osigurati da se rizik kontaminacije svede na najmanju moguću mjeru (npr. spremnik s očima treba držati na mokrom ledu tijekom prikupljanja i prijevoza, a HBSS-u u kojem su oči pohranjene tijekom prijevoza treba dodati antibiotike [npr. 100 IU/ml penicilina i 100 μg/ml streptomicina]).

Vremenski interval između prikupljanja očiju i uporabe rožnica u BCOP ispitnoj metodi trebao bi biti što kraći (oči se uobičajeno prikupljaju i upotrebljavaju istog dana) i trebalo bi dokazati da se njime ne dovode u pitanje rezultati analize. Ti se rezultati temelje na kriterijima za odabir očiju, kao i odgovorima pozitivnih i negativnih kontrola. Sve oči koje se upotrebljavaju u analizi trebale bi biti iz iste skupine očiju prikupljenih određenog dana.

Kriteriji za odabir očiju koje se upotrebljavaju u BCOP ispitnoj metodi

Kada stignu u laboratorij, oči se pažljivo pregledavaju kako bi se utvrdila oštećenja, uključujući povećano zamućenje, ogrebotine i neovaskularizaciju. Treba upotrebljavati samo rožnice očiju koja nemaju takvih oštećenja.

▼M7

Kvaliteta svake rožnice ocjenjuje se i u kasnijim fazama analize. Rožnice koje imaju zamućenje veće od sedam jedinica zamućenja ili istovjetnu vrijednost za upotrijebljeni opacimetar ili držače rožnice nakon početnog jednosatnog ujednačavanja treba odbaciti (NAPOMENA: opacimetar bi trebalo kalibrirati u skladu sa standardima zamućenja koji se primjenjuju za utvrđivanje jedinica zamućenja, vidjeti Dodatak 4.).

Svaka skupina za tretiranje (ispitivana kemikalija, istodobne negativne i pozitivne kontrole) sadržava najmanje tri oka. Za negativnu kontrolu u BCOP ispitnoj metodi trebalo bi upotrijebiti tri rožnice. Budući da su sve rožnice odvojene od čitavih očnih jabučica i zatim stavljene u komore držača rožnice, postoji mogućnost pojave artefakata kao posljedice rukovanja pri pojedinim vrijednostima zamućenja i propusnosti rožnice (uključujući negativne kontrole). Nadalje, vrijednosti zamućenja i propusnosti rožnica iz negativnih kontrola primjenjuju se za korekciju vrijednosti zamućenja i propusnosti rožnica tretiranih ispitivanom kemikalijom i tretiranih u pozitivnim kontrolama u izračunima IVIS-a.

POSTUPAK

Priprema očiju

Pri disekciji neoštećenih rožnica ostavlja se rub od 2 do 3 mm sklere kako bi se olakšalo naknadno rukovanje, pri čemu treba paziti da se ne oštete epitel i endotel rožnice. Izolirane rožnice postavljaju se na posebno konstruirane držače rožnice tako da je prednji odjeljak u kontaktu s epitelnom stranom rožnice, a stražnji s endotelnom stranom rožnice. Obje se komore do ruba pune prethodno zagrijanim Eagleovim minimalnim esencijalnim medijem (EMEM) bez fenolne crvene (prvo stražnja komora), vodeći računa o tome da se ne stvaraju mjehurići zraka. Uređaj se tada uravnotežuje na 32 ± 1 °C najmanje jedan sat kako bi se omogućilo uravnoteženje rožnica s medijem i, u mjeri u kojoj je to moguće, postigla normalna metabolička aktivnost (približna temperatura površine rožnice *in vivo* iznosi 32 °C).

Nakon razdoblja uravnoteženja u obje komore dodaje se svježi, prethodno zagrijani EMEM bez fenolne crvene i za svaku rožnicu očitava se polazna vrijednost zamućenja. Odbacuju se sve rožnice kod kojih je zapaženo makroskopsko oštećenje tkiva (npr. ogrebotine, pigmentacija, neovaskularizacija) ili zamućenje veće od sedam jedinica zamućenja odnosno zamućenje istovjetne vrijednosti za upotrijebljeni opacimetar ili držače rožnice. Kao rožnice za negativnu kontrolu (ili kontrolu s otapalom) odabiru se minimalno tri rožnice. Preostale rožnice zatim se razdjeljuju u skupine za tretiranje i pozitivne kontrolne skupine.

Budući da je toplinski kapacitet vode veći od toplinskog kapaciteta zraka, vodom se osiguravaju stabilniji temperaturni uvjeti za inkubaciju. Stoga se za održavanje držača rožnice i njegova sadržaja pri temperaturi od 32 ± 1 °C preporučuje uporaba vodene kupelji. Međutim, mogu se upotrebljavati i zračni inkubatori uz mjere opreza kako bi se održala stabilnost temperature (npr. prethodnim zagrijavanjem držača i medija).

Primjena ispitivane kemikalije

Za tretiranje se primjenjuju dva različita protokola, jedan za tekućine i površinski aktivne tvari (krute tvari ili tekućine) i jedan za površinski neaktivne krute tvari.

Tekućine se ispituju nerazrijeđene. Polukrute tvari, paste i voskovi obično se ispituju kao tekućine. Čiste površinski aktivne tvari ispituju se pri koncentraciji od 10 % w/v u otopini natrijevog klorida od 0,9 %, destiliranoj vodi ili drugom otapalu za koje je dokazano da nema negativnih učinaka na ispitni sustav. Za alternativne koncentracije razrjeđivanja trebalo bi navesti prikladno opravdanje. Smjese koje sadržavaju površinski aktivne tvari mogu se ispitivati nerazrijeđene

▼M7

ili razrijeđene na prikladnu koncentraciju ovisno o relevantnom scenariju izlaganja *in vivo*. Za ispitane koncentracije trebalo bi navesti prikladno opravdanje. Rožnice se izlažu tekućinama i površinski aktivnim tvarima deset minuta. Uporaba drugih vremena izlaganja trebala bi biti popraćena prikladnim znanstvenim opravdanjem. Definicije površinski aktivne tvari i smjese koja sadržava površinski aktivne tvari navedene su u Dodatku 1.

Površinski neaktivne krute tvari obično se ispituju kao otopine ili suspenzije pri koncentraciji od 20 % w/v u otopini natrijeva klorida od 0,9 %, destiliranoj vodi ili drugom otapalu za koje je dokazano da nema negativnih učinaka na ispitni sustav. U određenim okolnostima i uz primjereno znanstveno opravdanje krute tvari mogu se ispitivati i čiste izravnim nanošenjem na površinu rožnice metodom otvorene komore (vidjeti stavak 32.). Rožnice se izlažu krutim tvarima tijekom četiri sata, ali, kao i kod tekućina i površinski aktivnih tvari, moguća su alternativna vremena izlaganja uz prikladno znanstveno opravdanje.

Mogu se primjenjivati različite metode tretiranja ovisno o fizikalnoj naravi i kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije (npr. krute tvari, tekućine, viskozne ili neviskozne tekućine). Ključno je osigurati da je epitelna površina prikladno pokrivena ispitivanom kemikalijom i da se u fazama ispiranja ispitivana kemikalija pravilno ukloni. Za neviskozne do slabo viskozne tekuće ispitivane kemikalije uobičajeno se primjenjuje metoda zatvorene komore, dok se metoda otvorene komore obično primjenjuje za poluviskozne i viskozne tekuće ispitivane kemikalije i čiste krute tvari.

Kod metode zatvorene komore, količina ispitivane kemikalije (750 µl) dovoljna za prekrivanje epitelne strane rožnice uvodi se u prednju komoru kroz otvore za doziranje na gornjoj površini komore, koji se nakon toga hermetički zatvaraju čepovima i ostaju zatvoreni tijekom izlaganja. Važno je osigurati da svaka rožnica bude izložena ispitivanoj kemikaliji u odgovarajućem vremenu.

Kod metode otvorene komore, prije tretiranja s prednje se komore uklanja stakleni prozorčić i njegov prstenasti osigurač. Kontrolna ili ispitivana kemikalija (750 µl ili količina ispitivane kemikalije dovoljna za potpuno prekrivanje rožnice) mikropipetom se izravno nanosi na epitelnu površinu rožnice. Ako je ispitivanu kemikaliju teško pipetirati, radi lakšeg doziranja, ispitivana kemikalija može se pod tlakom napuniti u volumetrijsku pipetu. Vrh volumetrijske pipete umeće se u vrh šprice za doziranje tako da se materijal može pod tlakom napuniti u vrh volumetrijske pipete. Klip šprice potiskuje se istodobno s povlačenjem klipa pipete prema gore. Ako se u vrhu pipete pojave mjehurići zraka, ispitivana se kemikalija uklanja (izbacuje) i postupak se ponavlja dok vrh nije napunjen bez mjehurića zraka. Prema potrebi se može upotrijebiti obična šprica (bez igle) jer se njome omogućuje točno mjerenje volumena ispitivane kemikalije i lakše nanošenje na epitelnu površinu rožnice. Nakon doziranja stakleni prozorčić vraća se na prednju komoru čime se ponovno uspostavlja zatvoreni sustav.

Inkubacija nakon izlaganja

Nakon razdoblja izlaganja ispitivana kemikalija, kemikalija negativne kontrole ili kemikalija pozitivne kontrole uklanjaju se iz prednje komore i epitel se ispire najmanje tri puta (ili sve dok se više ne mogu zapaziti vidljivi dokazi ispitivane kemikalije) EMEM-om (koji sadržava fenolnu crvenu). Za ispiranje se upotrebljava medij koji sadržava fenolnu crvenu jer se u fenolnoj crvenoj može pratiti promjena boje kako bi se utvrdila učinkovitost ispiranja kiselih ili lužnatih ispitivanih kemikalija. Rožnice se ispiru više od tri puta ako fenolna crvena još nije

▼M7

obojena (ako je žuta ili ljubičasta) ili ako je još uvijek vidljiva ispitivana kemikalija. Nakon uklanjanja ispitivane kemikalije iz medija rožnice se završno ispiru EMEM-om (bez fenolne crvene). EMEM (bez fenolne crvene) se primjenjuje kao sredstvo za konačno ispiranje kako bi se osiguralo uklanjanje fenolne crvene iz prednje komore prije mjerenja zamućenja. Prednja komora zatim se ponovno puni svježim EMEM-om bez fenolne crvene.

Za tekućine i površinski aktivne tvari, rožnice se nakon ispiranja inkubiraju dodatna dva sata pri temperaturi od 32 ± 1 °C. U određenim okolnostima može biti korisno produljiti vrijeme nakon izlaganja, što se može razmotriti u svakom pojedinačnom slučaju. Rožnice tretirane krutim tvarima temeljito se ispiru po isteku četverosatnog razdoblja izlaganja, ali daljnja inkubacija nije potrebna.

Na kraju razdoblja inkubacije nakon izlaganja za tekućine i površinski aktivne tvari i na kraju četverosatnog razdoblja izlaganja za površinski neaktivne krute tvari bilježe se zamućenje i propusnost svake rožnice. Jednako tako, svaku se rožnicu vizualno promatra i bilježe se relevantna zapažanja (npr. ljuštenje tkiva, rezidualna ispitivana kemikalija, nejednolični obrasci zamućenja). Ta bi zapažanja mogla biti važna jer se mogu odraziti kao varijacije u očitavanjima opacimetra.

Kontrolne kemikalije

Svaki pokus uključuje istodobne negativne kontrole ili kontrole s otapalom/nosačem i pozitivne kontrole.

Kada se ispituje nerazrijeđena tekuća tvar, u BCOP ispitnu metodu uvodi se istodobna negativna kontrola (npr. otopina natrijeva klorida od 0,9 % ili destilirana voda) kako bi se mogle otkriti nespecifične promjene u ispitnom sustavu i kako bi se dobila polazna vrijednost za krajnje točke testa. Njome se osigurava i da se uvjetima provedbe testa ne izazove neprikladan odgovor na nadražujuću tvar.

Kada se ispituje razrijeđena tekućina, površinski aktivna tvar ili kruta tvar, u BCOP ispitnu metodu uvodi se istodobna kontrolna skupina s otapalom/nosačem kako bi se mogle otkriti nespecifične promjene u sustavu ispitivanja i kako bi se dobila polazna vrijednost za krajnje točke testa. Mogu se upotrebljavati samo otapala/nosači za koje je dokazano da nemaju negativne učinke na ispitni sustav.

Kemikalija za koju se zna da izaziva pozitivan odgovor uvodi se u svaki pokus kao istodobna pozitivna kontrola kako bi se provjerili integritet ispitnog sustava i pravilna provedba pokusa. Međutim, kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora u pozitivnoj kontroli tijekom vremena, jačina odgovora na nadražujuću tvar ne bi trebala biti prekomjerna.

Primjeri pozitivnih kontrola za tekuće ispitivane kemikalije su 100 %-tni etanol ili 100 %-tni dimetilformamid. Primjer pozitivne kontrole za krute ispitivane kemikalije je 20 % w/v imidazola u otopini natrijeva klorida od 0,9 %.

Referentne kemikalije korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih kemikalija iz specifičnog kemijskog razreda ili razreda proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje tvari koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću tvar.

Mjerenje krajnjih točaka

Zamućenje se utvrđuje na temelju količine prijenosa svjetlosti kroz rožnicu. Zamućenje rožnice mjeri se kvantitativno opacimetrom te se tako dobivaju vrijednosti zamućenja mjerene na kontinuiranoj ljestvici.

Propusnost se utvrđuje na temelju količine boje natrijeva fluoresceina koja prodire u sve slojeve stanice rožnice (tj. od epitela na vanjskoj površini rožnice do endotela na unutarnjoj površini rožnice). Dodaje se 1 ml otopine natrijeva fluoresceina (4 ili 5 mg/ml kada se ispituju tekućine i površinski aktivne tvari odnosno površinski neaktivne krute tvari) u prednju komoru držača rožnice, koji je u kontaktu s epitelnom stranom rožnice, dok se stražnja

▼M7

komora, koja je u kontaktu s endotelnom stranom rožnice, puni svježim EMEM-om. Držač se zatim inkubira u horizontalnom položaju 90 ± 5 min pri temperaturi od 32 ± 1 °C. Količina natrijeva fluoresceina koja prijeđe u stražnju komoru kvantitativno se mjeri UV/VIS spektrofotometrijom. Spektrofotometrijska mjerenja koja se ocjenjuju pri 490 nm bilježe se kao vrijednosti optičke gustoće (OD490) ili vrijednosti apsorbancije, koje se mjere na kontinuiranoj ljestvici. Vrijednosti propusnosti fluoresceina utvrđuju se primjenom vrijednosti OD490 na temelju spektrofotometra vidljive svjetlosti standardne duljine puta od 1 cm.

Kao druga mogućnost, može se upotrijebiti čitač pločica za mikrotitraciju s 96 bunarića pod uvjetom: i. da se za određivanje vrijednosti OD490 fluoresceina može utvrditi linearni raspon čitača pločica i ii. da se na pločici s 96 bunarića upotrebljavaju uzorci fluoresceina točnog volumena kako bi se dobile vrijednosti OD490 istovjetne standardnoj duljini puta od 1 cm (za što bi moglo biti potrebno potpuno napuniti bunarić [obično 360 μl]).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

Nakon korekcije vrijednosti (OD490) zamućenja i srednje izmjerene vrijednosti propusnosti s obzirom na osnovno zamućenje i na vrijednosti OD490 propusnosti negativne kontrole, srednje izmjerene vrijednosti OD490 zamućenja i propusnosti za svaku ispitnu skupinu trebalo bi kombinirati u empirijski izvedenoj formuli za izračun *in vitro* vrijednosti nadražujućeg djelovanja (IVIS) za svaku tretiranu skupinu kako slijedi:

IVIS = srednja izmjerena vrijednost zamućenja + (15 × srednja izmjerena vrijednost OD_{490} propusnosti).

Sina *et al*. (16.) izvijestili su da je ta formula izvedena tijekom unutarlaboratorijskih i međulaboratorijskih istraživanja. Podaci prikupljeni za niz od 36 spojeva u multilaboratorijskom istraživanju podvrgnuti su multivarijacijskoj analizi radi utvrđivanja najprikladnije jednadžbe između *in vivo* i *in vitro* podataka. Znanstvenici u dvama odvojenim poduzećima proveli su tu analizu i izveli gotovo identične jednadžbe.

Vrijednosti zamućenja i propusnosti trebalo bi neovisno ocjenjivati i kako bi se na temelju samo jedne od dviju krajnjih točaka utvrdilo je li ispitivana kemikalija izazvala nagrizanje ili jako nadraživanje (vidjeti Kriterije za donošenje odluke).

Kriteriji za donošenje odluke

Granične vrijednosti IVIS-a za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS) i ispitivanih kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS) navedene su nastavku.

IVIS	UN GHS
≤ 3	Bez kategorije
> 3; ≤ 55	Predviđanje nije moguće
> 55	Kategorija 1.

Kriteriji prihvatljivosti istraživanja

Ispitivanje se smatra prihvatljivim ako se u pozitivnoj kontroli dobije IVIS između dvaju standardnih odstupanja postojeće povijesne srednje izmjerene vrijednosti, koja se ažurira najmanje svaka tri mjeseca ili svaki put kada se u laboratorijima u kojima se ispitivanja ne provode često (tj. manje nego jednom mjesečno) provede prihvatljivo ispitivanje. Odgovorima u negativnoj kontroli ili kontroli s nosačem/otapalom trebale bi se dobiti vrijednosti zamućenja i propusnosti koje su manje od utvrđenih gornjih granica za osnovne vrijednosti zamućenja i propusnosti za goveđe rožnice tretirane odgovarajućom negativnom kontrolom ili kontrolom s otapalom/nosačem. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća najmanje tri rožnice trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je

▼M7

dobiveno razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata u prvom ciklusu ispitivanja, trebalo bi razmotriti mogućnost provođenja drugog ciklusa (koji, međutim, nije nužno potreban), a potom i trećeg u slučaju neusklađenih rezultata srednjeg izmjerenog IVIS-a između prvog i drugog ciklusa ispitivanja. U tom se kontekstu rezultat iz prvog ciklusa ispitivanja smatra graničnim ako predviđanja na temelju tri rožnice nisu bila usklađena tako da:

— na temelju dviju od triju rožnica dobivena su neusklađena predviđanja u odnosu na srednje izmjerene vrijednosti svih triju rožnica ILI

— na temelju jedne rožnice od triju rožnica dobiveno je neusklađeno predviđanje u odnosu na srednje izmjerene vrijednosti svih triju rožnica I neusklađeni rezultat bio je > 10 jedinica IVIS-a iz graničnog praga od 55.

— Ako se ponovljenim ciklusom ispitivanja potvrdi predviđanje iz početnog ciklusa ispitivanja (na temelju srednje izmjerene vrijednosti IVIS-a), konačna se odluka može donijeti bez daljnjih ispitivanja. Ako se ponovljenim ciklusom ispitivanja dobije neusklađeno predviđanje u odnosu na početni ciklus predviđanja (na temelju srednje izmjerene vrijednosti IVIS-a), trebalo bi provesti treći i konačni ciklus ispitivanja kako bi se riješila dvosmislena predviđanja i kako bi se razvrstala ispitivana kemikalija. Odustajanje od daljnjih ispitivanja u cilju razvrstavanja i označivanja može biti dopušteno ako je rezultat bilo kojeg od ciklusa ispitivanja predviđanje kategorije 1. sustava UN GHS.

Izvješće o ispitivanju

U izvješće o ispitivanju trebalo bi uključivati sljedeće informacije ako su one relevantne za provedbu istraživanja:

Ispitivane i kontrolne kemikalije

— kemijski naziv(i) kao što je strukturni naziv iz popisa Chemical Abstract Service (CAS) i ostali nazivi ako su poznati, CAS registarski broj (RN), ako je poznat,

— čistoća i sastav ispitivane/kontrolne kemikalije (u postotku prema masi) u mjeri u kojoj su te informacije raspoložive,

— fizikalno-kemijska svojstva, kao što su agregatno stanje, hlapljivost, pH, stabilnost, kemijski razred, topljivost u vodi relevantna za provedbu istraživanja,

— obrada ispitivanih/kontrolnih kemikalija prije ispitivanja ako je to primjenjivo (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— stabilnost, ako je poznata.

Informacije o naručitelju i ustanovi koja provodi ispitivanje:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja.

Uvjeti primjene ispitne metode:

— upotrijebljeni opacimetar (npr. model i specifikacije) i postavke instrumenta,

— informacije o kalibraciji uređaja upotrijebljenih za mjerenje zamućenja i propusnosti (npr. opacimetra i spektrofotometra) radi osiguravanja linearnosti mjerenja,

— vrsta upotrijebljenih držača rožnice (npr. model i specifikacije),

▼M7

— opis druge upotrijebljene opreme,

— postupak primijenjen za osiguravanje integriteta (tj. točnosti i pouzdanosti) ispitne metode tijekom vremena (npr. periodično ispitivanje kemikalija za ispitivanje osposobljenosti).

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

— rasponi prihvatljivih istodobnih pozitivnih i negativnih kontrola na temelju ranijih podataka,

— ako je primjenjivo, rasponi prihvatljivih istodobnih referentnih kontrola na temelju ranijih podataka.

Prikupljanje i priprema očiju:

— identifikacija dobavljača očiju (tj. pogona u kojem su oči prikupljene),

— promjer rožnica kao mjerilo dobi životinja od kojih su dobivene i prikladnosti za analizu,

— uvjeti pohrane i prijevoza očiju (npr. datum i vrijeme prikupljanja očiju, vrijeme proteklo do početka ispitivanja, prijevozna sredstva i temperaturni uvjeti, svi upotrijebljeni antibiotici),

— priprema i postavljanje goveđih rožnica, uključujući izjave o njihovoj kvaliteti, temperatura držača rožnice i kriteriji za odabir rožnica upotrijebljenih u ispitivanju.

Ispitni postupak:

— broj ponovljenih uzoraka,

— identitet upotrijebljenih negativnih i pozitivnih kontrola (uključujući, ako je to primjenjivo, i kontrole s otapalom te referentne kontrole),

— koncentracija ispitivane kemikalije, primjena, vrijeme izlaganja i primijenjeno vrijeme inkubacije nakon izlaganja,

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

— opis primijenjenih kriterija za donošenje odluke.

Rezultati

— tablični prikaz podataka o pojedinačnim ispitnim uzorcima (npr. vrijednosti zamućenja, vrijednosti OD490 i izračunati IVIS za ispitivanu kemikaliju te pozitivne, negativne i referentne kontrole [ako su uključene] prikazani u obliku tablice, uključujući, prema potrebi, podatke iz ponovljenih pokusa s ponovljenim uzorcima i srednje izmjerene vrijednosti ± standardno odstupanje za svaki pokus),

— opis drugih zapaženih učinaka,

— izvedeno *in vitro* razvrstavanje u skladu sa sustavom UN GHS, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

▼M7

LITERATURA

1. ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2. ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

3. OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

4. UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5. 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., and 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.

6. ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. U: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

7. ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. U: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

8. INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

9. Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

10. Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

11. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupno na: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

12. Maurer, J.K., Parker, R.D. and 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.

13. OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

14. Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

15. Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

16. Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

17. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadražujuće/nagrizajuće djelovanje na oko.

18. ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

19. OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

    Dostupno na: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

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

Referentna kemikalija: kemikalija koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna kemikalija trebala bi imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom kemikalija koje se ispituju; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci i v. poznatu snagu u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Rožnica: transparentni dio prednje strane očne jabučice kojim su prekrivene šarenica i zjenica i koji propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

Zamućenje rožnice: izmjereni stupanj zamućenja rožnice nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Povećano zamućenje rožnice pokazatelj je oštećenja rožnice. Zamućenje se može ocjenjivati subjektivno kao u Draizeovom ispitivanju na oku kunića ili objektivno instrumentom kao što je „opacimetar”.

Propusnost rožnice: kvantitativno izmjereno oštećenje epitela rožnice utvrđivanjem količine boje natrijeva fluoresceina koja prolazi kroz sve slojeve stanice rožnice.

Nadraživanje oka: promjene na oku nastale kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS” (4.).

Stopa lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

***In vitro* vrijednost nadražujućeg djelovanja (IVIS)**: empirijski izvedena formula koja se primjenjuje u BCOP ispitnoj metodi i u kojoj se srednje izmjerene vrijednosti zamućenja i propusnosti za svaku tretiranu skupinu kombiniraju u jednu *in vitro* vrijednost za svaku tretiranu skupinu. IVIS = srednja izmjerena vrijednost zamućenja + (15 × srednja izmjerena vrijednost propusnosti).

Ireverzibilni učinci na oko: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

▼M7

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari u kojoj one ne reagiraju (4.).

Negativna kontrola: netretiran ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Nerazvrstano: kemikalije koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka (kategorija 2., 2.A ili 2.B sustava UN GHS) ili tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „bez kategorije prema sustavu UN GHS”.

Opacimetar: instrument koji se upotrebljava za mjerenje „zamućenja rožnice” kvantitativnim ocjenjivanjem prijenosa svjetlosti kroz rožnicu. Tipični instrument ima dva odjeljka, svaki s vlastitim izvorom svjetlosti i fotoćelijom. Jedan odjeljak upotrebljava se za tretiranu rožnicu, a drugi za kalibraciju instrumenta i podešavanje na nulu. Svjetlost iz halogene svjetiljke šalje se kroz kontrolni odjeljak (praznu komoru bez prozorčića ili tekućine) na fotoćeliju i uspoređuje sa svjetlošću koja se šalje na fotoćeliju kroz pokusni odjeljak u kojem je smještena komora s rožnicom. Uspoređuje se razlika u prijenosu svjetlosti s fotoćelija, a numerička vrijednost zamućenja prikazuje se na digitalnom zaslonu.

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

Reverzibilni učinci na oko: vidjeti „nadraživanje oka”.

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

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS” (4.).

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji uključuje sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač, koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdio polazni odgovor za uzorke tretirane ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom negativnom kontrolom, tim se uzorkom dokazuje i jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni bilo kojim proizvodnim procesom, uključujući sve dodatke koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te sve nečistoće proizišle iz primijenjenog procesa, ali isključujući sva otapala koja se mogu odvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava (4.).

▼M7

Površinski aktivna tvar: tvar, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, a kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje.

Smjesa koja sadržava površinski aktivne tvari: u kontekstu ove ispitne metode, to je smjesa koja sadržava jednu ili više površinski aktivnih tvari pri konačnoj koncentraciji > 5 %.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da uzrokuje tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ispitivanoj kemikaliji ne može pripisati potencijal za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevitog sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva, kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima s ciljem zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (4.).

Kategorija 1. sustava UN GHS: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS: kemikalije koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „nerazvrstano”.

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu.

Ocjenjivanje snage dokaza: proces razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti ispitivane kemikalije.

▼M7

Dodatak 2.

PREDIKTIVNA SPOSOBNOST BCOP ISPITNE METODE

Tablica 1.

Prediktivna sposobnost BCOP ispitne metode za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka [kategorija 1. sustava UN GHS / prema Uredbi EU-a o CLP-u u odnosu na kategorije koje nisu kategorija 1. (kategorija 2. + izvan kategorije); kategorija I. Agencije za zaštitu okoliša SAD-a (US EPA) u odnosu na kategorije koje nisu kategorija I. (kategorija II. + kategorija III. + kategorija IV.)]

Sustav razvrstavanja	Br.	Točnost		Osjetljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.
UN GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tablica 2.

Prediktivna sposobnost BCOP ispitne metode za utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka („tvari koje nemaju nadražujuće djelovanje”) [izvan kategorije prema sustavu UN GHS / Uredbi EU-a o CLP-u u odnosu na kemikalije koje nisu izvan kategorije (kategorija 1. + kategorija 2.); kategorija IV. US EPA-e u odnosu na kategorije koje nisu kategorija IV. (kategorija I. + kategorija II. + kategorija III.)]

Sustav razvrstavanja	Br.	Točnost		Osjetljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.
UN GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Dodatak 3.

KEMIKALIJE ZA ISPITIVANJE OSPOSOBLJENOSTI ZA BCOP ISPITNU METODU

Prije rutinske primjene ove ispitne metode laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost točnim utvrđivanjem kategorije opasnosti za oko za 13 kemikalija preporučenih u tablici 1. Odabrane kemikalije čine raspon odgovora u pogledu opasnosti za oko na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (TG 405) (17.) i sustava razvrstavanja UN GHS (tj. kategorija 1., 2.A, 2.B ili nerazvrstano) (4.). Ostali kriteriji odabira bili su komercijalna dostupnost kemikalija, dostupnost visokokvalitetnih referentnih *in vivo* podataka i dostupnost visokokvalitetnih *in vitro* podataka iz BCOP ispitne metode. Referentni podaci dostupni su u Jednostavnom sažetku (*Streamlined Summary Document*) (3.) i Osnovnom dokumentu za preispitivanje (*Background Review Document*) ICCVAM-a za BCOP ispitnu metodu (2. i 18.).

Tablica 1.

Kemikalije preporučene za dokazivanje tehničke osposobljenosti za BCOP ispitnu metodu

Kemikalija	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	*In vivo* razvrstavanje ([2])	Razvrstavanje prema BCOP-u
Benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Klorheksidin	55-56-1	Amin, amidin	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Dibenzoil-L-vinska kiselina	2743-38-6	Karboksilna kiselina, ester	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Imidazol	288-32-4	Heterociklički	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Trikloroctena kiselina (30 %)	76-03-9	Karboksilna kiselina	Tekućina	Kategorija 1.	Kategorija 1.
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	Acil halid	Tekućina	Kategorija 2.A	Točno/pouzdano predviđanje nije moguće
Etil-2-metilacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Tekućina	Kategorija 2.B	Točno/pouzdano predviđanje nije moguće
Amonijev nitrat	6484-52-2	Anorganska sol	Kruta tvar	Kategorija 2. ([3])	Točno/pouzdano predviđanje nije moguće
EDTA, dikalijeva sol	25102-12-9	Amin, karboksilna kiselina (sol)	Kruta tvar	Nerazvrstano	Nerazvrstano
Tween 20	9005-64-5	Ester, polieter	Tekućina	Nerazvrstano	Nerazvrstano
2-merkatopirimidin	1450-85-7	Acil halid	Kruta tvar	Nerazvrstano	Nerazvrstano
Fenilbutazon	50-33-9	Heterociklički	Kruta tvar	Nerazvrstano	Nerazvrstano

▼M7

Kemikalija	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	*In vivo* razvrstavanje ([2])	Razvrstavanje prema BCOP-u
Polioksietilen 23 lauril eter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Tekućina	Nerazvrstano	Nerazvrstano

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

([1]) Za svaku ispitivanu kemikaliju određen je kemijski razred uz primjenu standardne sheme razvrstavanja na temelju sustava razvrstavanja Nacionalne knjižnice oznaka medicinskog nazivlja (MeSH) (dostupno na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (OECD TG 405) (17.) i uz primjenu sustava UN GHS (4.).

([3]) Razvrstavanje u kategorije 2.A i 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od triju životinja ili dvije od triju životinja imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim crvenila konjunktive kod jedne životinje, sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost crvenila konjunktive 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila desetog dana.

▼M7

Dodatak 4.

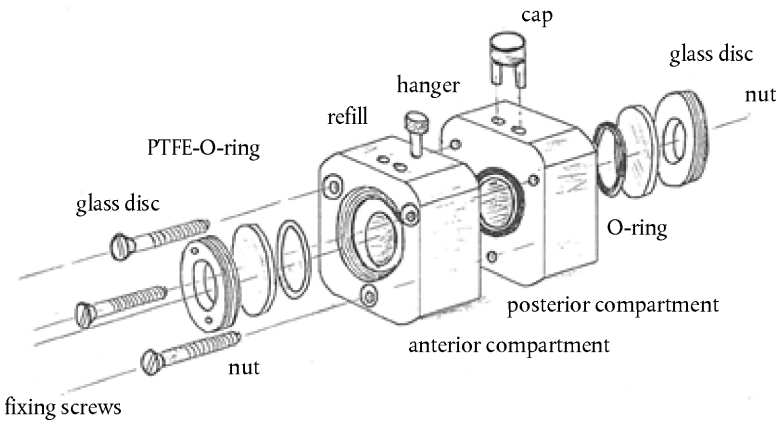
DRŽAČ ROŽNICE ZA BCOP ISPITNU METODU

Držači rožnice za BCOP ispitnu metodu izrađeni su od inertnog materijala (npr. polipropilena). Držači se sastoje od dvije polovine (prednje i stražnje komore) i imaju dvije slične cilindrične unutarnje komore. Svaka komora ima zapreminu od približno 5 ml i završava staklenim prozorčićem kroz koji se bilježe izmjerena zamućenja. Svaka od unutarnjih komora ima promjer od 1,7 cm i duboka je 2,2 cm ([1]). O-prsten smješten na stražnjoj komori služi za sprečavanje istjecanja. Rožnice se postavljaju endotelnom stranom prema dolje na o-prsten stražnjih komora, dok se prednje komore postavljaju na epitelnu stranu rožnica. Komore su učvršćene trima vijcima od nehrđajućeg čelika smještenima na vanjskim rubovima komore. Na kraju svake komore nalazi se stakleni prozorčić koji se može ukloniti radi lakšeg pristupa rožnici. Radi sprečavanja istjecanja, jedan o-prsten smješten je i između staklenog prozorčića i komore. Dvama otvorima s gornje strane svake komore omogućuje se uvođenje i uklanjanje medija i ispitivanih kemikalija. Tijekom tretiranja i inkubacije zatvaraju se gumenim čepovima. Zbog trošenja ili nakupljanja ostataka određenih kemikalija u utorima unutarnje komore ili na staklenim prozorčićima može doći do promjene u prijenosu svjetlosti kroz držače rožnice, što može utjecati na raspršenje ili refleksiju svjetlosti. Moguće su posljedice povećanja ili smanjenja polazne vrijednosti prijenosa svjetlosti (kao i polazne vrijednosti očitanja zamućenja) kroz držače rožnice, koje su vidljive kao zamjetne promjene u očekivanim početnim mjerenjima polaznih vrijednosti zamućenja rožnice u pojedinačnim komorama (tj. početne vrijednosti zamućenja rožnice u posebnim pojedinačnim držačima rožnice mogu se rutinski razlikovati za dvije do tri jedinice zamućenja od očekivanih polaznih vrijednosti). Svaki laboratorij trebao bi razmotriti uspostavljanje programa za ocjenjivanje promjena u prijenosu svjetlosti kroz držače rožnice, ovisno o naravi ispitivanih kemija i učestalosti uporabe komora. Radi utvrđivanja polaznih vrijednosti, prije rutinske uporabe držači rožnice mogu se provjeriti mjerenjem polaznih vrijednosti zamućenja (ili prijenosa svjetlosti) za komore koje su napunjene potpunim medijem, ali bez rožnica. Nakon toga se držači rožnice periodički provjeravaju kako bi se utvrdile promjene u prijenosu svjetlosti tijekom uporabe. Svaki laboratorij može utvrditi učestalost provjera držača rožnice na temelju ispitivanih kemikalija, učestalosti uporabe i zapažanja promjena u polaznim vrijednostima zamućenja rožnice. Ako su zapažene vidljive promjene u prijenosu svjetlosti kroz držače rožnice, moraju se razmotriti prikladni postupci čišćenja i/ili poliranja unutarnje površine držača rožnice ili zamjena.

([1]) Navedene dimenzije temelje se na držaču rožnice koji se upotrebljava za krave u dobi od 12 do 60 mjeseci. Ako se upotrebljavaju životinje u dobi od šest do 12 mjeseci, držač bi umjesto toga trebalo konstruirati tako da svaka komora ima zapreminu od 4 ml i da svaka unutarnja komora ima promjer od 1,5 cm i dubinu od 2,2 cm. Kod svakog novokonstruiranog držača rožnice vrlo je važno da bi omjer izložene površine rožnice i zapremine stražnje komore trebao biti jednak omjeru kao kod tradicionalnog držača rožnice. To je nužno kako bi se osiguralo točno utvrđivanje vrijednosti propusnosti za izračun IVIS-a na temelju predložene formule.

▼M7

Držač rožnice: dijagram uređaja u rastavljenom stanju



▼M7

Dodatak 5.

OPACIMETAR

Opacimetar je uređaj za mjerenje prijenosa svjetlosti. Na primjer, za opremu OP-KIT poduzeća Electro Desing (Riom, Francuska) koja se upotrebljava za validaciju BCOP ispitne metode, svjetlost iz halogene svjetiljke šalje se kroz kontrolni odjeljak (praznu komoru bez prozorčića ili tekućine) na fotoćeliju i uspoređuje sa svjetlošću koja se šalje na fotoćeliju kroz pokusni odjeljak u kojem je smještena komora s rožnicom. Uspoređuje se razlika u prijenosu svjetlosti s fotoćelija, a numerička vrijednost zamućenja prikazuje se na digitalnom zaslonu. Utvrđuju se jedinice zamućenja. Mogu se primjenjivati druge vrste opacimetara s drukčijim postavkama (npr. opacimetri kod kojih se ne zahtijevaju paralelna mjerenja kontrolnih i pokusnih odjeljaka) ako se dokaže da se njima dobivaju slični rezultati kao i potvrđenom opremom.

Opacimetrom bi se trebao dobiti linearan odgovor u obliku niza očitanja zamućenja kojima su obuhvaćene granične vrijednosti za različita razvrstavanja opisana modelom predviđanja (tj. do granične vrijednosti kojom se utvrđuje nagrizajuće djelovanje/jako nadražujuće djelovanje). Kako bi se osigurala linearna i točna očitanja do 75 – 80 jedinica zamućenja, opacimetar treba kalibrirati serijom kalibratora. Kalibratori se postavljaju u komoru za kalibraciju (komoru držača rožnice koja je konstruirana tako da se u nju mogu smjestiti kalibratori) i očitavaju se vrijednosti na opacimetru. Kalibracijska komora konstruirana je tako da su kalibratori postavljeni na približno jednakoj udaljenosti između svjetlosti i fotoćelije na koju bi se kod mjerenja zamućenja postavile rožnice. Referentne vrijednosti i početna podešena vrijednost ovise o vrsti upotrijebljene opreme. Linearnost mjerenja zamućenja trebalo bi osigurati prikladnim postupcima (specifičnima za instrument). Na primjer, ako se primjenjuje oprema OP-KIT poduzeća Electro Design (Riom, Francuska), opacimetar se prvo kalibrira na 0 jedinica zamućenja upotrebom kalibracijske komore bez kalibratora. Zatim se u kalibracijsku komoru postavljaju tri različita kalibratora jedan po jedan i mjere se zamućenja. Kalibratorima 1., 2. i 3. trebala bi se dobiti očitanja zamućenja jednaka njihovim podešenim vrijednostima od 75, 150 odnosno 225 jedinica zamućenja ±5 %.

▼M7

B.48. METODA ISPITIVANJA NA IZOLIRANOM PILEĆEM OKU ZA UTVRĐIVANJE I. KEMIKALIJA KOJE IZAZIVAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I II. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 438 (2013.). Metodu ispitivanja na izoliranom pilećem oku (ICE) ocijenio je Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) u suradnji s Europskim centrom za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) i Japanskim centrom za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM) 2006. i 2010. (1., 2. i 3.). Tijekom prvog ocjenjivanja ICE ispitna metoda odobrena je kao znanstveno valjana ispitna metoda za primjenu u obliku testa probira za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1.), kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1., 2. i 4.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]). Tijekom drugog ocjenjivanja ICE ispitne metode ocjenjivala se njezina primjena u obliku testa probira za utvrđivanje kemikalija koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka kako je utvrđeno sustavom UN GHS (3. i 4.). Rezultatima validacijskog istraživanja i preporukama odbora za stručnu reviziju potvrđene su izvorne preporuke za primjenu ICE ispitne metode za razvrstavanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS) jer je raspoloživa baza podataka ostala neizmijenjena od izvorne validacije ICCVAM-a. U toj fazi nisu dane daljnje preporuke za proširenje područja primjene ICE ispitne metode kako bi se uključile i druge kategorije. *In vitro* i *in vivo* skup podataka upotrijebljen u validacijskom istraživanju ponovno je ocijenjen s naglaskom na ocjenjivanje korisnosti ICE ispitne metode za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (5.). U ponovnom je ocjenjivanju zaključeno da se ICE ispitna metoda može primjenjivati i za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, kako je utvrđeno sustavom UN GHS (4. i 5.). U ovu su ispitnu metodu uključene preporučene primjene i ograničenja ICE ispitne metode na temelju tih ocjenjivanja. Glavne razlike između izvorne verzije Smjernice za ispitivanje OECD-a iz 2009. i ažurirane verzije iz 2013. uključuju, među ostalim, primjenu ICE ispitne metode za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS, ažuriranje elemenata izvješća o ispitivanju, ažuriranje Dodatka 1. o definicijama i ažuriranje Dodatka 2. o kemikalijama za ispitivanje osposobljenosti.

Trenutačno je opće prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku neće moći zamijeniti nijednim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem nadraživanja oka za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu nadraživanja. Međutim, kao zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja (6.). Pristup odozgo prema dolje (7.) trebalo bi primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će kemikalija imati veliki potencijal za nadražujuće djelovanje, dok bi se pristup odozdo prema gore (7.) trebao primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će nadraživanje oka koje prouzroči kemikalija biti takvo da će kemikaliju biti potrebno razvrstati. ICE ispitna metoda jest *in vitro* ispitna metoda koja se u određenim okolnostima i uz

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

▼M7

posebna ograničenja opisana u stavcima 8. i 10. može primjenjivati za razvrstavanje i označivanje kemikalija s obzirom na opasnosti za oko. Iako se ne smatra valjanom kao samostalna zamjena za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, ICE ispitna metoda preporučuje se kao početni korak u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozgo prema dolje koji predlažu Scott *et al.* (7.) za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka odnosno kemikalija koje bez daljnjeg ispitivanja treba razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS (4.). ICE ispitna metoda preporučuje se i za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, kako je utvrđeno sustavom UN GHS (bez kategorije) (4.) i stoga se može primjenjivati kao početni korak u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozdo prema gore (7.). Međutim, za kemikaliju za koju nije predviđeno da će uzrokovati tešku ozljedu oka ili da će biti nerazvrstana s obzirom na nadraživanje oka / tešku ozljedu oka na temelju ICE ispitne metode bit će potrebno dodatno ispitivanje (*in vitro* i/ili *in vivo*) za utvrđivanje konačnog razvrstavanja. Nadalje, prije primjene ICE ispitne metode u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima.

Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko mjerenog njezinom sposobnošću izazivanja ili neizazivanja toksičnosti u enukleiranom pilećem oku. Toksični učinci na rožnicu mjere se i. kvalitativnom ocjenom zamućenja, ii. kvalitativnom ocjenom oštećenja epitela zbog primjene fluoresceina na oko (zadržavanje fluoresceina), iii. kvantitativnim mjerenjem povećane debljine (oticanja) i iv. kvalitativnim ocjenjivanjem makroskopskog morfološkog oštećenja površine. Zamućenje, oticanje i oštećenje rožnice nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ocjenjuju se pojedinačno, a zatim se ocjene kombiniraju kako bi se utvrdilo razvrstavanje s obzirom na nadražujuće djelovanje na oko.

Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ova se ispitna metoda temelji na protokolu predloženom u Smjernici OECD-a 160 (8.), koja je izrađena nakon međunarodnog validacijskog istraživanja ICCVAM-a (1., 3. i 9.), uz doprinose iz Europskog centra za validaciju alternativnih metoda, Japanskog centra za validaciju alternativnih metoda i Odjela za toksikologiju i primijenjenu farmakologiju organizacije TNO Quality of Life (Nizozemska). Protokol se temelji na informacijama dobivenima iz objavljenih protokola, kao i protokola koji organizacija TNO trenutačno primjenjuje (10., 11., 12., 13. i 14.).

Tijekom validacijskog istraživanja na kojem se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, a empirijskom bazom podataka validacijskog istraživanja bile su obuhvaćene 152 kemikalije, uključujući 72 tvari i 80 smjesa (5.). Ispitna metoda primjenjiva je na krute tvari, tekućine, emulzije i gelove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskom istraživanju.

ICE ispitna metoda može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka odnosno kemikalija koje treba razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS (4.). Kada se primjenjuje u tu svrhu, utvrđena se ograničenja ICE ispitne metode temelje na visokim stopama lažno pozitivnih rezultata za alkohole i visokim stopama lažno negativnih rezultata za krute tvari i površinski aktivne tvari (1., 3. i 9.). Međutim, stope lažno negativnih rezultata (kategorija 1. sustava UN GHS za koju je utvrđeno da nije kategorija 1. sustava UN GHS) nisu kritične u tom kontekstu jer će se sve ispitivane kemikalije s negativnim rezultatom naknadno ispitati drugim *in vitro* ispitivanjima potvrđenima na odgovarajući način ili, kao krajnja opcija, na zečevima, ovisno o regulatornim zahtjevima, uz primjenu strategije sekvencijskog ispitivanja u okviru pristupa koji se temelji

▼M7

na ocjenjivanju snage dokaza. Trebalo bi napomenuti da krute tvari mogu dovesti do promjenjivih i ekstremnih uvjeta izlaganja u *in vivo* Draizeovom ispitivanju nadraživanja oka, što za posljedicu može imati nevažna predviđanja u pogledu njihova stvarnog potencijala za nadražujuće djelovanje (15.). Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode za sve vrste kemikalija, pri čemu bi pozitivan rezultat trebalo prihvatiti kao pokazatelj teške ozljede oka, odnosno razvrstavanja u kategoriju 1. sustava UN GHS bez daljnjeg ispitivanja. Međutim, pozitivne rezultate dobivene s alkoholima trebalo bi oprezno tumačiti zbog rizika od precijenjenih rezultata.

Kada se primjenjuje za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS), ICE ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 86 % (120/140), stopu lažno pozitivnih rezultata od 6 % (7/113) i stopu lažno negativnih rezultata od 48 % (13/27) u odnosu na podatke dobivene metodom *in vivo* ispitivanja na oku kunića razvrstane u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS (4. i 5.).

ICE ispitna metoda može se primjenjivati i za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS (4.). Prije primjene ICE ispitne metode u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama razvrstavanja trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima. Ova se ispitna metoda može primjenjivati za sve vrste kemikalija, pri čemu negativni rezultat može biti prihvatljiv za nerazvrstavanje kemikalije s obzirom na nadraživanje oka i tešku ozljedu oka. Međutim, na temelju jednog rezultata iz validacijske baze podataka moguće je podcijenjeno predviđanje u pogledu boja protiv obrastanja koje sadržavaju organsko otapalo (5.).

Kada se primjenjuje za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, ICE ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 82 % (125/152), stopu lažno pozitivnih rezultata od 33 % (26/79) i stopu lažno negativnih rezultata od 1 % (1/73) u odnosu na podatke dobivene metodom *in vivo* ispitivanja na oku kunića razvrstane u skladu sa sustavom UN GHS (4. i 5.). Ako se iz baze podataka isključe ispitivane kemikalije iz određenih razreda (tj. boje protiv obrastanja koje sadržavaju organsko otapalo), ICE ispitna metoda ima točnost od 83 % (123/149), stopu lažno pozitivnih rezultata od 33 % (26/78) i stopu lažno negativnih rezultata od 0 % (0/71) prema sustavu razvrstavanja UN GHS (4. i 5.).

ICE ispitna metoda ne preporučuje se za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje bi trebalo razvrstati kao kemikalije koje nadražuju oči (tj. u kategoriju 2. ili kategoriju 2.A sustava UN GHS) ili ispitivanih kemikalija koje bi trebalo razvrstati kao kemikalije koje blago nadražuju oči (kategorija 2.B sustava UN GHS) zbog znatnog broja kemikalija iz kategorije 1. sustava UN GHS koje su razvrstane u nedovoljno visoke kategorije 2., 2.A ili 2.B sustava UN GHS te zbog kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS koje su razvrstane u previsoke kategorije 2., 2.A ili 2.B sustava UN GHS. U tu svrhu može biti potrebno daljnje ispitivanje drugom prikladnom metodom.

Svi postupci s pilećim očima trebali bi biti u skladu s primjenjivim propisima ustanove koja provodi ispitivanje i postupcima za rukovanje materijalom dobivenim od ljudi ili životinja, koji među ostalim uključuje tkiva i tkivne tekućine. Preporučuju se općenite mjere opreza za laboratorije (16.).

Iako se u okviru ICE ispitne metode ne razmatraju ozljede konjunktive i šarenice koje se ocjenjuju metodom ispitivanja nadražujućeg djelovanja na zečje oko, razmatraju se učinci na rožnicu, koji su glavni pokretač *in vivo* razvrstavanja uzimajući u obzir razvrstavanje u skladu sa sustavom UN GHS. Nadalje, iako se reverzibilnost lezija rožnice ne može sama po sebi ocijeniti ICE ispitnom metodom, na temelju istraživanja na zečjem oku predloženo je da se za utvrđivanje

▼M7

određenih vrsta ireverzibilnih učinaka može primjenjivati ocjena početne dubine ozljede rožnice (17.). Potrebne su daljnje znanstvene spoznaje kako bi se razumjelo kako nastaju ireverzibilni učinci koji nisu povezani s početnom ozljedom visoke razine. Naposljetku, ICE ispitnom metodom ne omogućuje se procjena potencijala za sustavnu toksičnost povezanu s izlaganjem oka.

Ovu će se ispitnu metodu povremeno ažurirati uzimajući u obzir nove informacije i podatke. Na primjer, histopatologija može biti korisna ako je potreban potpuniji opis oštećenja rožnice. Kako bi se ocijenila ta mogućnost, korisnike se potiče da konzerviraju oči i pripreme histopatološke uzorke koji se mogu upotrijebiti za izradu baze podataka i kriterija za donošenje odluka kojima se može dodatno poboljšati točnost ove ispitne metode. OECD je izradio Smjernicu za primjenu metoda *in vitro* ispitivanja toksičnosti za oko koja uključuje detaljne postupke za uzimanje histopatoloških uzoraka i informacije o tome kamo treba dostaviti uzorke i/ili histopatološke podatke (8.).

Svi laboratoriji koji su započeli s uspostavljanjem ove analize trebali bi upotrebljavati kemikalije za ispitivanje osposobljenosti navedene u Dodatku 2. Laboratorij može upotrebljavati te kemikalije kako bi dokazao svoju tehničku osposobljenost za provedbu ICE ispitne metode prije dostave podataka o ICE ispitnoj metodi u svrhu regulatornog razvrstavanja s obzirom na opasnost.

NAČELO ISPITIVANJA

ICE ispitna metoda organotipski je model kojim se osigurava kratkotrajno održavanje pilećeg oka *in vitro*. U ovoj ispitnoj metodi, oštećenje uzrokovano ispitivanom kemikalijom procjenjuje se utvrđivanjem oticanja i zamućenja rožnice te zadržavanja fluoresceina. Zadnja dva parametra podrazumijevaju kvalitativnu ocjenu, a analizom oticanja rožnice dobiva se kvantitativna ocjena. Svako se mjerenje pretvara u kvantitativnu vrijednost za izračun sveukupnog indeksa nadraživanja ili mu se dodjeljuje kvalitativna kategorizacija za razvrstavanje kemikalije kao *in vitro* opasne za oko, bilo u kategoriju 1. sustava UN GHS ili kao nerazvrstanu prema UN GHS. Bilo koji od tih dvaju ishoda može se zatim upotrijebiti za predviđanje moguće *in vivo* teške ozljede oka ili nepostojanja potrebe za razvrstavanje ispitivane kemikalije prema opasnosti za oko (vidjeti kriterije za donošenje odluke). Ipak, nije moguće razvrstati kemikalije za koje nije predviđeno da uzrokuju tešku ozljedu oka ili da su nerazvrstane na temelju ICE ispitne metode (vidjeti stavak 11.).

Izvor i starost pilećih očiju

U testu se inače upotrebljavaju oči prikupljene od pilića iz klaonice gdje su usmrćeni za ljudsku potrošnju, čime se uklanja potreba za laboratorijskim životinjama. Upotrebljavaju se oči samo zdravih životinja koje se smatraju prikladnima za uvrštavanje u lanac ljudske prehrane.

Iako nije provedeno kontrolirano istraživanje za ocjenu optimalne starosti pilića, starost i tjelesna masa pilića koji su se ranije upotrebljavali u ovoj ispitnoj metodi jesu starost i tjelesna masa mladih pilića koji se tradicionalno prerađuju u klaonici peradi (tj. pilići približne starosti od sedam tjedana i tjelesne mase od 1,5 do 2,5 kg).

Prikupljanje i prijevoz očiju u laboratorij

Glave bi trebalo ukloniti odmah nakon sedacije pilića, uobičajeno električnim šokom i rezanjem vrata radi otjecanja krvi. Trebalo bi pronaći lokalnog dobavljača pilića u blizini laboratorija kako bi se pileće glave mogle brzo prevesti iz klaonice u laboratorij i time na najmanju moguću mjeru sveli propadanje i/ili bakteriološka kontaminacija. Vrijeme od prikupljanja pilećih glava do stavljanja očiju u komoru za superfuziju nakon enukleacije trebalo bi biti što je kraće moguće (uobičajeno najviše dva sata) kako bi se osiguralo ispunjavanje kriterija prihvatljivosti analize. Sve oči koje se upotrebljavaju u analizi trebale bi biti iz iste skupine očiju prikupljenih određenog dana.

▼M7

Budući da se disekcija očiju obavlja u laboratoriju, netaknute glave prevoze se iz klaonice pri temperaturi okoline (obično između 18 °C i 25 °C) u plastičnim kutijama ovlaženima ručnicima natopljenima izotoničnom fiziološkom otopinom.

Kriteriji za odabir očiju i broj očiju koje se upotrebljava u ICE ispitnoj metodi

Odbacuju se oči koje imaju visoku polaznu vrijednost obojenosti fluoresceinom (tj. > 0,5) ili visoku polaznu vrijednost zamućenja rožnice (tj. > 0,5) nakon enukleacije.

Sve skupine za tretiranje i istodobne pozitivne kontrole uključuju najmanje tri oka. Negativna kontrolna skupina ili kontrola s otapalom (ako se kao otapalo ne upotrebljava fiziološka otopina) uključuje najmanje jedno oko.

U slučaju krutih materijala za koje je rezultat izvan kategorije prema sustavu GHS, preporučuje se drugi ciklus s tri oka kako bi se potvrdio ili odbacio negativan ishod.

POSTUPAK

Priprema očiju

Očni kapci oprezno se izrezuju, pazeći pritom da se ne ošteti rožnica. Integritet rožnice brzo se ocjenjuje kapljicom 2 %-tnog (w/v) natrijeva fluoresceina koji se nanosi na površinu rožnice, ostavlja tamo nekoliko sekundi i zatim ispire izotoničnom fiziološkom otopinom. Oči tretirane fluoresceinom zatim se pregledava mikroskopom s procjepnom svjetiljkom kako bi se provjerilo je li rožnica neoštećena (tj. jesu li vrijednosti zadržavanja fluoresceina i zamućenja rožnice $\leq$ 0,5).

Ako je neoštećeno, oko se zatim dalje secira iz lubanje, pazeći pritom da se ne ošteti rožnica. Očna jabučica izvlači se iz orbite tako da se treći očni kapak čvrsto uhvati kirurškom pincetom i očni mišići prerežu zakrivljenim škarama s tupim vrhom. Važno je da se prejakim pritiskom (tj. artefaktima tlačenja) ne ošteti rožnica.

Nakon što je uklonjeno iz orbite, na oku bi trebao ostati vidljiv dio očnog živca. Oko se odmah nakon uklanjanja iz orbite stavlja na upijajući podložak te se izrezuju treći kapak i ostalo vezivno tkivo.

Enukleirano oko postavlja se u stezaljku od nehrđajućeg čelika s rožnicom postavljenom vertikalno. Stezaljka se zatim prenosi u komoru uređaja za superfuziju (18.). Stezaljku bi trebalo postaviti u uređaj za superfuziju tako da se osigura nakapavanje čitave rožnice izotoničnom fiziološkom otopinom (tri do četiri kapi u minuti ili od 0,1 do 0,15 ml/min). U komorama uređaja za superfuziju temperaturu bi trebalo kontrolirati na 32 ± 1,5 °C. U Dodatku 3. nalazi se dijagram tipskog uređaja za superfuziju i stezaljke za oko, koji se mogu komercijalno nabaviti ili izraditi. Uređaj se može prilagoditi kako bi se zadovoljile potrebe pojedinih laboratorija (npr. tako da se u njega može postaviti drukčiji broj očiju).

Oči se nakon postavljanja u uređaj za superfuziju ponovno pregledavaju mikroskopom s procjepnom svjetiljkom kako bi se osiguralo da nisu oštećene u postupku disekcije. Za to bi vrijeme na apeksu rožnice trebalo izmjeriti i debljinu rožnice uređajem za mjerenje dubine na mikroskopu s procjepnom svjetiljkom. Oči s: i. vrijednošću zadržavanja fluoresceina > 0,5; ii. zamućenjem rožnice > 0,5 ili iii. bilo kojim drugim znakovima oštećenja trebalo bi zamijeniti. Kada je riječ o očima koje nisu odbačene na temelju bilo kojeg od tih kriterija, treba odbaciti svako oko s debljinom rožnica koja za više od 10 % odstupa od srednje vrijednosti za sve oči Korisnici bi trebali znati da se mikroskopima s procjepnom svjetiljkom s različito podešenom širinom procjepa svjetiljke mikroskopa mogu dobiti različita mjerenja debljine rožnice. Širina procjepa trebala bi biti podešena na 0,095 mm.

▼M7

Nakon njihova pregleda i odobrenja, sve se oči inkubira približno 45 do 60 minuta kako bi se uravnotežile sa sustavom ispitivanja prije primjene doze. Nakon razdoblja ujednačavanja za debljinu i zamućenje rožnice kao referentno mjerenje bilježi se nula (tj. vrijeme = 0) koja služi kao polazna vrijednost. Vrijednost fluoresceina utvrđena tijekom seciranja primjenjuje se kao polazna mjera za tu krajnju točku.

Primjena ispitivane kemikalije

Odmah nakon nultih referentnih mjerenja oko se (u držaču) uklanja iz uređaja za superfuziju, postavlja u horizontalni položaj i ispitivana se kemikalija nanosi na rožnicu.

Tekuće ispitivane kemikalije uobičajeno se ispituju nerazrijeđene, ali ih se može razrijediti ako se to smatra potrebnim (npr. kao dio plana istraživanja). Poželjno je otapalo za razrijeđene ispitivane kemikalije fiziološka otopina. Međutim, u kontroliranim se uvjetima mogu primjenjivati i alternativna otapala, ali prikladnost drugih otapala osim fiziološke otopine treba dokazati.

Tekuće ispitivane kemikalije nanose se na rožnicu tako da se čitava površina rožnice jednakomjerno prekrije ispitivanom kemikalijom; standardni volumen iznosi 0,03 ml.

Ako je to moguće, krute ispitivane kemikalije trebalo bi što finije usitniti mužarom i tučkom ili sličnim alatom za usitnjavanje. Prah se nanosi na rožnicu tako da se površina rožnice jednakomjerno prekrije ispitivanom kemikalijom; standardna količina iznosi 0,03 g.

Nanesena ispitivana (tekuća ili kruta) kemikalija djeluje 10 sekundi i zatim se ispire iz oka izotoničnom fiziološkom otopinom (približno 20 ml) pri temperaturi okoline. Oko se (u svojem držaču) zatim vraća u uređaj za superfuziju u prvobitnom uspravnom položaju. Po potrebi se nakon primjene u trajanju od 10 sekundi i u kasnijim vremenskim točkama (npr. nakon otkrivanja ostataka ispitivane kemikalije na rožnici) može primijeniti dodatno ispiranje. Općenito, količina fiziološke otopine dodatno upotrijebljene za ispiranje nije kritična, ali važno je standarde pri primjeni kemikalije na rožnicu.

Kontrolne kemikalije

Svaki bi pokus trebao uključivati istodobne negativne kontrole ili kontrole s otapalom/nosačem i pozitivne kontrole.

Kada se ispituju nerazrijeđene tekućine ili krute tvari, kao istodobna negativna kontrola u ICE ispitnoj metodi primjenjuje se fiziološka otopina kako bi se otkrile nespecifične promjene u ispitnom sustavu i kako bi se osiguralo da uvjeti provedbe testa ne dovedu do neprimjerenog odgovora na nadražujuću tvar.

Kada se ispituju razrijeđene tekućine, u ispitnu se metodu uključuje istodobna kontrolna skupina s otapalom/nosačem kako bi se otkrile nespecifične promjene u ispitnom sustavu i kako bi se osiguralo da uvjeti provedbe testa ne dovedu do neprimjerenog odgovora na nadražujuću tvar. Kako je navedeno u stavku 31., mogu se upotrebljavati samo otapala/nosači za koje je dokazano da nemaju negativne učinke na ispitni sustav.

Tvar za koju se zna da nadražuje oči uvodi se u svaki pokus kao istodobna pozitivna kontrola kako bi se potvrdio nastanak prikladnog odgovora. Budući da se u ovoj ispitnoj metodi za utvrđivanje nagrizajućih ili jako nadražujućih tvari primjenjuje ICE test, pozitivna kontrola trebala bi biti referentna kemikalija koja u toj ispitnoj metodi izaziva snažan odgovor. Međutim, kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena,

▼M7

odgovor ne bi smio biti presnažan. Trebalo bi generirati dovoljno *in vitro* podataka o pozitivnoj kontroli kako bi se za pozitivnu kontrolu mogao izračunati statistički utvrđen prihvatljivi raspon. Ako za određenu pozitivnu kontrolu nisu dostupni odgovarajući raniji podaci o ICE ispitnoj metodi, možda će biti potrebno provesti istraživanja kako bi se došlo do tih podataka.

Primjeri pozitivnih kontrola za tekuće ispitivane kemikalije su 10 %-tna octena kiselina ili 5 %-tni benzalkonijev klorid, dok su primjeri pozitivnih kontrolna za krute ispitivane kemikalije natrijev hidroksid ili imidazol.

Referentne kemikalije korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih kemikalija iz specifičnog kemijskog razreda ili razreda proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje tvari koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću tvar.

Mjerenje krajnjih točaka

Tretirane rožnice ocjenjuju se prije tretiranja u 30., 75., 120., 180. i 240. minuti (±5 minuta) nakon ispiranja poslije tretiranja. Tim se vremenskim točkama osigurava prikladan broj mjerenja tijekom četverosatnog tretiranja, ostavljajući dovoljno vremena između mjerenja za potrebna zapažanja za sve oči.

Krajnje točke koje se ocjenjuju jesu zamućenje i oticanje rožnice, zadržavanje fluoresceina i morfološki učinci (tj. pojava rupica ili slabljenje epitela). Sve krajnje točke, osim zadržavanja fluoresceina (koje se utvrđuje samo prije tretiranja i 30 minuta nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji), utvrđuju se u svakoj od prethodno navedenih vremenskih točaka.

Preporučuje se fotografijama dokumentirati zamućenje rožnice, zadržavanje fluoresceina, morfološke učinke i histopatologiju, ako je provedena.

Nakon posljednjeg pregleda po isteku četiri sata korisnike se potiče da oči konzerviraju u prikladnom fiksativu (npr. u neutralnom puferiranom formalinu) za eventualnu histopatološku pretragu (za pojedinosti vidjeti stavak 14. i literaturu pod 8.).

Oticanje rožnice utvrđuje se mjerenjima debljine rožnice optičkim pahimetrom na mikroskopu s procjepnom svjetiljkom. Izražava se kao postotak, a izračunava iz mjerenja debljine rožnice prema sljedećoj formuli:

$$\left(\frac{\textit{debljina rožnice u vremenu } t - \textit{debljina rožnice u vremenu} = 0}{\textit{debljina rožnice u vremenu} = 0} \right) \times 100$$

Srednji se postotak oticanja rožnice za sve ispitivane oči izračunava za sve vremenske točke zapažanja. Na temelju najveće srednje vrijednosti oticanja rožnice, bez obzira na to u kojoj je vremenskoj točki zapažena, dobiva se opća vrijednost za kategoriju za svaku ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 51.).

Za ocjenjivanje zamućenja rožnice uzima se najjače zamućena površina rožnice pri utvrđivanju vrijednosti iz tablice 1. Srednja izmjerena vrijednost zamućenja rožnice za sve ispitivane oči izračunava se za sve vremenske točke zapažanja. Na temelju najveće srednje vrijednosti zamućenja rožnice, bez obzira na to u kojoj je vremenskoj točki zapažena, dobiva se opća vrijednost za kategoriju za svaku ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 51.).

▼M7

Tablica 1.

Vrijednosti zamućenja rožnice.

Vrijednost	Zapažanje
0	Nema zamućenja
0,5	Vrlo slabo zamućenje
1	Raspršena ili difuzna područja; detalji šarenice jasno su vidljivi
2	Jasno vidljiva prozirna područja; detalji šarenice lagano su zasjenjeni
3	Jako zamućenje rožnice; specifični detalji šarenice nisu vidljivi; veličina zjenice jedva se razaznaje
4	Potpuno zamućenje rožnice; šarenica nije vidljiva

Zadržavanje fluoresceina ocjenjuje se samo u 30-minutnom intervalu zapažanja kako je prikazano u tablici 2. Srednja vrijednost zadržavanja fluoresceina za sve ispitivane oči zatim se izračunava za 30-minutni interval zapažanja i upotrebljava za opću vrijednost za kategoriju za svaku ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 51.).

Tablica 2.

Vrijednost zadržavanja fluoresceina.

Vrijednost	Zapažanje
0	Nema zadržavanja fluoresceina
0,5	Vrlo slaba obojenost pojedinačnih stanica
1	Obojenost pojedinačnih stanica raspršena po cijelom tretiranom području rožnice
2	Gusta obojenost pojedinačnih stanica, fokalno ili konfluentno
3	Zadržavanje fluoresceina na velikim područjima rožnice, konfluentno

Morfološki učinci uključuju „rupice” na epitelnim stanicama rožnice, „slabljenje” epitela, „grublju” površinu rožnice i „lijepljenje” ispitivane kemikalije za rožnicu. Ti nalazi mogu varirati s obzirom na jačinu i mogu se javiti istodobno. Razvrstavanje tih nalaza subjektivno je i temelji se na tumačenju istraživača.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

Rezultate zamućenja i oticanja rožnice te zadržavanja fluoresceina trebalo bi ocjenjivati odvojeno kako bi se dobio ICE razred za svaku krajnju točku. ICE razredi za svaku krajnju točku zatim se kombiniraju kako bi se svaku ispitivanu kemikaliju razvrstalo s obzirom na nadražujuće djelovanje.

Kriteriji za donošenje odluke

Nakon ocjenjivanja svih krajnjih točaka mogu se odrediti ICE razredi na temelju unaprijed utvrđenog raspona. Oticanje rožnice (tablica 3.), zamućenje rožnice (tablica 4.) i zadržavanje fluoresceina (tablica 5.) tumače se primjenom četiriju ICE razreda u skladu s ljestvicama navedenima u nastavku. Važno je napomenuti da su vrijednosti oticanja rožnice prikazane u tablici 3. primjenjive samo ako se

▼M7

debljinu mjeri mikroskopom (npr. procjepnom svjetiljkom Haag-Streit BP900) s uređajem za mjerenje dubine br. 1. i širinom procjepa podešenom na 9 $\frac{1}{2}$, što je jednako 0,095 mm. Korisnici bi trebali znati da se mikroskopima s različito podešenom širinom procjepa svjetiljke mogu dobiti različita mjerenja debljine rožnice.

Tablica 3.

Kriteriji razvrstavanja za oticanje rožnice prema ICE-u.

Srednja izmjerena vrijednost oticanja rožnice (%) (*)	Razred prema ICE-u
0 do 5	I.
> 5 do 12	II.
> 12 do 18 (> 75 min nakon tretiranja)	II.
> 12 do 18 (≤ 75 min nakon tretiranja)	III.
> 18 do 26	III.
> 26 do 32 (> 75 min nakon tretiranja)	III.
> 26 do 32 (≤ 75 min nakon tretiranja)	IV.
> 32	IV.

(*) Najveća srednja vrijednost zapažena u bilo kojoj vremenskoj točki.

Tablica 4.

Kriteriji razvrstavanja za zamućenje prema ICE-u.

Maksimalna srednja vrijednost zamućenja (*)	ICE razred
0,0 – 0,5	I.
0,6 – 1,5	II.
1,6 – 2,5	III.
2,6 – 4,0	IV.

(*) Maksimalna srednja vrijednost zapažena u bilo kojoj vremenskoj točki (na temelju vrijednosti zamućenja definiranih u tablici 1.).

Tablica 5.

Kriteriji razvrstavanja za srednju izmjerenu vrijednost zadržavanja fluoresceina prema ICE-u.

Srednja vrijednost zadržavanja fluoresceina 30 minuta nakon tretiranja (*)	Razred prema ICE-u
0,0 – 0,5	I.
0,6 – 1,5	II.
1,6 – 2,5	III.
2,6 – 3,0	IV.

(*) Na temelju vrijednosti definiranih u tablici 2.

In vitro razvrstavanje ispitivane kemikalije ocjenjuje se tumačenjem razvrstavanja prema sustavu GHS koje odgovara kombinaciji kategorija dobivenih za oticanje rožnice, zamućenje rožnice i zadržavanje fluoresceina kako je opisano u tablici 6.

▼M7

Tablica 6.

Opća *in vitro* razvrstavanja.

Razvrstavanje u skladu sa sustavom UN GHS	Kombinacije triju krajnjih točaka
Bez kategorije	3 × I. 2 × I., 1 × II.
Predviđanje nije moguće	Ostale kombinacije
Kategorija 1.	3 × IV. 2 × IV., 1 × III. 2 × IV., 1 × II. (*) 2 × IV., 1 × I. (*) Zamućenje rožnice ≥ 3 nakon 30 min (najmanje dva oka) Zamućenje rožnice = 4 u bilo kojoj vremenskoj točki (najmanje dva oka) Jako slabljenje epitela (najmanje jedno oko)

(*) Kombinacije koje se rjeđe javljaju.

Kriteriji prihvatljivosti istraživanja

Ispitivanje se smatra prihvatljivim ako se istodobnim negativnim kontrolama ili kontrolama s nosačem/otapalom i istodobnim pozitivnim kontrolama kemikalije ne mogu razvrstati prema GHS-u odnosno razvrstaju se u kategoriju 1. sustava GHS.

Izvješće o ispitivanju

U izvješće o ispitivanju trebalo bi uključiti sljedeće informacije ako su relevantne za provedbu istraživanja:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

— kemijski naziv(i) kao što je strukturni naziv iz popisa Chemical Abstract Service (CAS) i ostali nazivi, ako su poznati,

— CAS registarski broj (RN), ako je poznat,

— čistoća i sastav ispitivanih/kontrolnih kemikalija (u postotku prema masi) u mjeri u kojoj su te informacije raspoložive,

— fizikalno-kemijska svojstva, kao što su agregatno stanje, hlapljivost, pH, stabilnost, kemijski razred, topljivost u vodi relevantna za provedbu istraživanja,

— tretiranje ispitivanih/kontrolnih kemikalija prije ispitivanja ako je to primjenjivo (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— stabilnost, ako je poznata;

Informacije o naručitelju i ustanovi koja provodi ispitivanje:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— identifikacija dobavljača očiju (npr. pogona u kojem su oči prikupljene);

Uvjeti primjene ispitne metode:

— opis upotrijebljenog ispitnog sustava,

▼M7

— upotrijebljeni mikroskop s procjepnom svjetiljkom (npr. model) i postavke instrumenta za upotrijebljeni mikroskop s procjepnom svjetiljkom,

— upućivanje na ranije rezultate negativnih i pozitivnih kontrola i, ako je to primjenjivo, na ranije podatke kojima se dokazuju prihvatljivi rasponi istodobnih referentnih kontrola,

— postupak primijenjen za osiguravanje integriteta (tj. točnosti i pouzdanosti) ispitne metode u određenom vremenu (npr. povremeno ispitivanje kemikalija za ispitivanje osposobljenosti).

Prikupljanje i priprema očiju:

— starost i tjelesna masa životinje donora i, ako su raspoloživa, druga posebna svojstva životinja od kojih su prikupljene oči (npr. starost, soj),

— uvjeti pohrane i prijevoza očiju (npr. datum i vrijeme prikupljanja očiju, vrijeme proteklo od prikupljanja pilećih glava do stavljanja enukleiranih očiju u komoru za superfuziju),

— priprema i postavljanje očiju, uključujući izjave o njihovoj kvaliteti, temperatura držača oka i kriteriji za odabir očiju upotrijebljenih u ispitivanju.

Ispitni postupak

— broj ponovljenih uzoraka,

— identitet upotrijebljenih negativnih i pozitivnih kontrola (uključujući, ako je to primjenjivo, i kontrole s otapalom te referentne kontrole),

— doza ispitivane kemikalije, primjena i primijenjeno vrijeme izlaganja,

— vremenske točke zapažanja (prije i poslije tretiranja),

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,

— opis mogućih izmjena ispitne metode.

Rezultati

— tablični prikaz vrijednosti oticanja i zamućenja rožnice te zadržavanja fluoresceina dobivenih za svako pojedinačno oko i u svakoj vremenskoj točki zapažanja, uključujući srednje vrijednosti u svako vrijeme zapažanja za sve ispitane oči,

— najveće zapažene srednje vrijednosti oticanja i zamućenja rožnice te zadržavanja fluoresceina (u bilo kojoj vremenskoj točki) i pripadajući razred prema ICE-u,

— opis svih drugih zapaženih učinaka,

— izvedeno *in vitro* razvrstavanje u skladu sa sustavom GHS,

— fotografije očiju, ako je to prikladno.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

▼**M7**

LITERATURA

1. ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Dostupno na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

3. ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

4. United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5. Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

6. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadražujuće/nagrizajuće djelovanje na oko.

7. Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, 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. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

8. OECD (2011) Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants". Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

9. ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupno na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

10. Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

11. DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Dostupno na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

12. Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13. Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

14. Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

15. Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

16. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupno na: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

17. Maurer, J.K., Parker, R.D. and 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.

18. Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Appendix 1

DEFINICIJE

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

Referentna kemikalija: kemikalija koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna kemikalija trebala bi imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom kemikalija koje se ispituju; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci i v. poznatu jakost u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjevit pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Rožnica: transparentni dio prednje strane očne jabučice kojim su prekrivene šarenica i zjenica i koji propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

Zamućenje rožnice: izmjereni stupanj zamućenja rožnice nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Povećano zamućenje rožnice pokazatelj je oštećenja rožnice.

Oticanje rožnice: objektivno mjerenje u okviru ICE ispitne metode stupnja izduženosti rožnice nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Izražava se postotkom, a izračunava se iz polaznih mjerenja (prije primjene doze) debljine rožnice i debljine koja se bilježi u redovitim intervalima nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji u ICE ispitnoj metodi. Stupanj oticanja rožnice pokazatelj je oštećenja rožnice.

Nadraživanje oka: promjene na oku nastale kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS” (4.).

Stopa lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Zadržavanje fluoresceina: subjektivno mjerenje u okviru ICE ispitne metode stupnja zadržavanja fluorescein natrija u epitelnim stanicama rožnice nakon izlaganja ispitivanoj tvari. Stupanj zadržavanja fluoresceina pokazatelj je oštećenja epitela rožnice.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Ireverzibilni učinci na oko: vidjeti „teška ozljeda oka” i „kategorija 1. sustava UN GHS”.

▼M7

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari u kojoj one ne reagiraju (4.).

Negativna kontrola: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Izvan sustava razvrstavanja: kemikalije koje nisu razvrstane s obzirom na nadraživanje oka (kategorija 2. sustava UN GHS) ili tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „izvan kategorije prema sustavu UN GHS”.

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

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

Reverzibilni učinci na oko: vidjeti „nadraživanje oka” i „kategorija 2. sustava UN GHS”.

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS” (4.).

Biomikroskop: instrument koji se upotrebljava za izravan pregled oka pod povećalom binokularnog mikroskopa stvaranjem uspravne stereoskopske slike. U ICE ispitnoj metodi taj se instrument upotrebljava za promatranje prednjih struktura pilećeg oka, kao i za objektivno mjerenje debljine rožnice prigrađenim uređajem za mjerenje dubine.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji uključuje sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdio polazni odgovor za uzorke tretirane ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom negativnom kontrolom, tim se uzorkom dokazuje i jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni bilo kojim proizvodnim procesom, uključujući sve dodatke koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te sve nečistoće proizišle iz primijenjenog procesa, ali isključujući sva otapala koja se mogu odvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava (4.).

Površinski aktivna tvar: tvar, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, a kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje.

▼M7

Pristup odozgo prema dolje: stupnjevit pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da uzrokuje tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ne može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, provodi se postupak stupnjevitog sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva, kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima s ciljem zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (4.).

Kategorija 1. sustava UN GHS: vidjeti „teška ozljeda oka” i/ili „ireverzibilni učinci na oko”.

Kategorija 2. sustava UN GHS: vidjeti „nadraživanje oka” i/ili „reverzibilni učinci na oko”.

Izvan kategorije prema sustavu UN GHS: tvari koje ne ispunjuju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „izvan sustava razvrstavanja”.

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu.

Ocjenjivanje snage dokaza: proces razmatranja prednosti i nedostataka različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti kemikalije.

▼M7

Dodatak 2.

KEMIKALIJE ZA ISPITIVANJE OSPOSOBLJENOSTI ZA ICE ISPITNU METODU

Prije rutinske primjene ispitne metode koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost točnim utvrđivanjem kategorije opasnosti za oči za 13 kemikalija preporučenih u tablici 1. Odabrane kemikalije čine raspon odgovora u pogledu opasnosti za oči na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (TG 405) i sustava razvrstavanja UN GHS (tj. kategorija 1., 2.A i 2.B sustava UN GHS ili izvan kategorije) (4. i 6.). Ostali kriteriji odabira bili su komercijalna dostupnost kemikalija, dostupnost visokokvalitetnih referentnih *in vivo* podataka i postojanje visokokvalitetnih podataka iz ICE *in vitro* ispitne metode. Referentni podaci dostupni su u Jednostavnom sažetku (engl. *Streamlined Summary Document,* SSD) (5.) i ICCVAM-ovom Osnovnom dokumentu za preispitivanje (engl. *Background Review Document*) za ICE ispitnu metodu (9.).

Tablica 1.

Kemikalije preporučene za dokazivanje tehničke osposobljenosti za ICE ispitnu metodu

Kemikalija	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Fizikalni oblik	Razvrstavanje *in vivo* ([2])	Razvrstavanje *in vitro* ([3])
Benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Klorheksidin	55-56-1	Amin, amidin	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Dibenzoil-L-vinska kiselina	2743-38-6	Karboksilna kiselina, ester	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Imidazol	288-32-4	Heterociklički	Kruta tvar	Kategorija 1.	Kategorija 1.
Trikloroctena kiselina (30 %)	76-03-9	Karboksilna kiselina	Tekućina	Kategorija 1.	Kategorija 1.
2,6-diklorobenz-oil klorid	4659-45-4	Acil halid	Tekućina	Kategorija 2.A	Predviđanje nije moguće ([4])
Amonijev nitrat	6484-52-2	Anorganska sol	Kruta tvar	Kategorija 2.A ([5])	Predviđanje nije moguće ([4])
Etil-2-metilaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Tekućina	Kategorija 2.B	Predviđanje nije moguće ([4])
Dimetil sulfoksid	67-68-5	Organski spoj sumpora	Tekućina	Izvan kategorije	Izvan kategorije
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Tekućina	Izvan kategorije	Izvan kategorije (granična vrijednost)
Metilciklopentan	96-37-7	Ugljikovodik (ciklički)	Tekućina	Izvan kategorije	Izvan kategorije
n-heksan	110-54-3	Ugljikovodik (aciklički)	Tekućina	Izvan kategorije	Izvan kategorije

▼M7

Kemikalija	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Fizikalni oblik	Razvrstavanje *in vivo* ([2])	Razvrstavanje *in vitro* ([3])
Triacetin	102-76-1	Lipid	Tekućina	Izvan sustava razvrstavanja	Izvan kategorije

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

([1]) Za svaku ispitivanu kemikaliju određeni su kemijski razredi uz primjenu standardne sheme razvrstavanja na temelju sustava razvrstavanja Nacionalne knjižnice oznaka medicinskog nazivlja (MeSH) (dostupno na adresi http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (OECD TG 405) i uz primjenu sustava UN GHS (4. i 6.).

([3]) Na temelju rezultata ICE ispitne metode kako je opisano u tablici 6.

([4]) Kombinacija vrijednosti iz ICE ispitne metode osim onih opisanih u tablici 6. za utvrđivanje da je kemikalija izvan kategorije prema sustavu GHS i da je razvrstana u kategoriju 1. sustava GHS (vidjeti tablicu 6.).

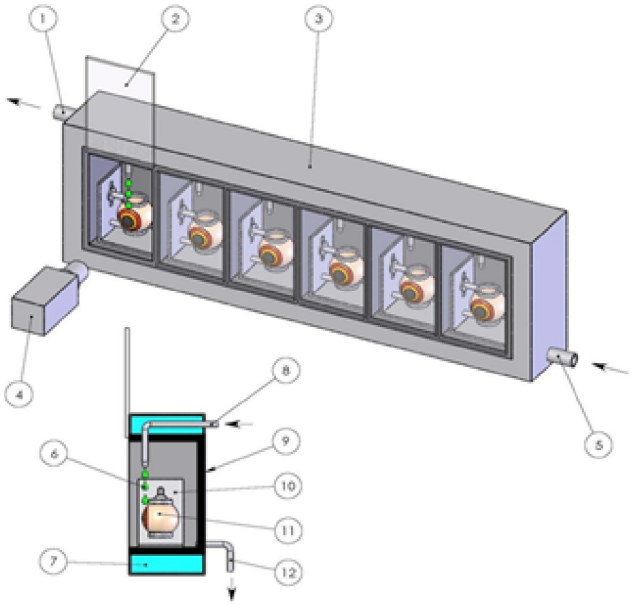
([5]) Razvrstavanje u kategorije 2.A i 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od triju životinja ili dvije od triju životinja imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim crvenila konjunktive kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost crvenila konjunktive 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila desetog dana.

▼M7

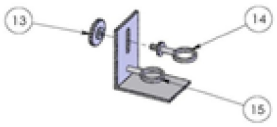
Dodatak 3.

DIJAGRAMI UREĐAJA ZA SUPERFUZIJU I STEZALJKE ZA OKO U ICE ISPITNOJ METODI

(Vidjeti Burton et al. *(18.) za dodatne generičke opise uređaja za superfuziju i stezaljke za oko)*



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Broj stavke	Opis	Broj stavke	Opis
1	Izlaz za toplu vodu	9	Odjeljak
2	Klizna vrata	10	Držač oka
3	Uređaj za superfuziju	11	Pileće oko
4	Optički mjerni uređaj	12	Izlaz za fiziološku otopinu
5	Ulaz za toplu vodu	13	Usadni vijak
6	Fiziološka otopina	14	Podesiva gornja ručica
7	Topla voda	15	Nepomična donja ručica
8	Ulaz za fiziološku otopinu		

▼M7

B.49. *IN VITRO* MIKRONUKLEUS-TEST NA STANICAMA SISAVACA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje 487 (2016.). Dio je niza metoda za ispitivanje u području genetske toksikologije. Sastavljen je dokument OECD-a u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena tih smjernica za ispitivanje (1).

Mikronukleus-test *in vitro* (MNvit) je test genotoksičnosti za otkrivanje mikronukleusa (MN) u citoplazmi interfaznih stanica. Mikronukleusi mogu nastati iz acentričnih kromosomskih fragmenata (tj. onih bez centromere) ili cijelih kromosoma koji tijekom anafaze diobe stanice nisu sposobni putovati na polove. Stoga je mikronukleus-test *in vitro* metoda *in vitro* koja pruža sveobuhvatnu osnovu za istraživanje potencijala za kromosomsko oštećenje *in vitro* jer omogućuje otkrivanje aneugenih i klastogenih agensa (2. i 3.) u stanicama u kojima je tijekom ili nakon izloženosti ispitivanoj kemikaliji došlo do diobe (više je detalja navedeno u stavku 13.). Mikronukleusi predstavljaju oštećenje koje je preneseno na stanice kćeri, dok se kromosomske aberacije u metafaznim stanicama ne moraju nužno prenijeti. U oba slučaja promjene mogu biti nepogodne za preživljavanje stanica.

Ova ispitna metoda dopušta upotrebu protokola s citohalazinom B (citoB), inhibitorom polimerizacije aktina, ili bez njega. Dodavanje citohalazina B prije mitoze dovodi do dvojezgrenih stanica te stoga omogućuje identifikaciju i analizu mikronukleusa samo u onim stanicama koje su dovršile jednu mitozu (4. i 5.). U ovoj je ispitnoj metodi dopuštena upotreba protokola bez blokirane citokineze pod uvjetom da postoje dokazi da je u analiziranoj staničnoj populaciji mitoza već dovršena.

Osim primjene mikronukleus-testa *in vitro* za određivanje kemikalija koje uzrokuju nastajanje mikronukleusa, upotrebom imunokemijskog označivanja kinetohora ili hibridizacije centromernim/telomernim sondama (fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)) mogu se isto tako dobiti dodatni podaci o mehanizmima oštećenja kromosoma i nastajanja mikronukleusa (6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16. i 17.). Postupci označivanja i hibridizacije mogu se primijeniti u slučaju povećanog nastajanja mikronukleusa kada istraživač želi utvrditi je li povećanje posljedica klastogenih i/ili aneugenih djelovanja.

Budući da se mikronukleusi u interfaznim stanicama mogu ocijeniti relativno objektivno, laboratorijsko osoblje treba utvrditi samo broj dvojezgrenih stanica ako je upotrijebljen citohalazin B te pojavnost stanica s mikronukleusima u svim slučajevima. Predmetna se stakalca stoga mogu pregledati relativno brzo i analiza može biti automatizirana. Time se u praksi omogućuje da se pri svakom tretiranju ocijeni na tisuće umjesto na stotine stanica, čime se povećava snaga tog testa. Naposljetku, s obzirom na to da mikronukleusi mogu nastati iz zaostalih kromosoma, postoji mogućnost otkrivanja tvari koje uzrokuju aneuploidiju i koje se teško proučavaju u uobičajenim ispitivanjima kromosomskih aberacija, npr. poput onih opisanih u poglavlju B.10. ovog Priloga (18.). Međutim, mikronukleus-testom *in vitro* opisanim u ovoj ispitnoj metodi ne omogućuje se razlikovanje kemikalija koje uzrokuju promjene u broju kromosoma i/ili ploidiju od onih koje uzrokuju klastogenost bez primjene posebnih tehnika, poput metode FISH navedene u stavku 4.

Mikronukleus-test *in vitro* je robustan i može se provesti na različitim vrstama stanica u prisutnosti ili odsutnosti citohalazina B. Postoje opširni podaci kojima se podupire valjanost mikronukleus-testa *in vitro* kod različitih vrsta stanica (kultura staničnih linija ili primarnih staničnih kultura) (19., 20., 21., 22., 23., 24., 25., 26., 27., 28., 29., 30., 31., 32., 33., 34., 35., 36.). To su u prvom redu međunarodne validacijske studije kojima koordinira *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19., 20., 21., 22., 23.) te izvješća Međunarodne radionice o ispitivanju genotoksičnosti (engl. *International Workshop on Genotoxicity Testing*) (5., 17.). Dostupni podaci bili su isto tako ponovno ocijenjeni u

▼M7

retrospektivnoj validacijskoj studiji s obzirom na snag dokaza, koju je proveo Europski centar za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) Europske komisije, dok je Znanstveni savjetodavni odbor ECVAM-a (ESAC) ispitnu metodu potvrdio kao znanstveno valjanu (37., 38., 39.).

U mikronukleus-testu *in vitro* na stanicama sisavaca mogu se upotrijebiti kulture staničnih linija ili primarne stanične kulture podrijetlom od ljudi ili glodavaca. Budući da osnovna učestalost mikronukleusa utječe na osjetljivost testa, preporučuje se upotreba staničnih vrsta sa stabilnom i utvrđenom osnovnom učestalošću nastajanja mikronukleusa. Stanice koje se upotrebljavaju odabiru se na temelju sposobnosti da dobro rastu u kulturi, stabilnosti kariotipa (uključujući broj kromosoma) te spontane učestalosti mikronukleusa (40.). Podacima koji su dostupni u ovom trenutku ne omogućuje se davanje čvrstih preporuka, ali oni upućuju na to da je pri ocjenjivanju kemijskih opasnosti važno uzeti u obzir status proteina p53, genetsku (kariotipsku) stabilnost, sposobnost popravka DNK i podrijetlo stanica odabranih za ispitivanje (potječu li od sisavaca ili od ljudi). Korisnike ove ispitne metode potiče se da razmotre utjecaj tih i drugih značajki stanica na uspješnost stanične linije u otkrivanju indukcije mikronukleusa, s obzirom na razvoj novih spoznaja u tom području.

Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* općenito zahtijevaju uporabu egzogenih izvora metaboličke aktivacije osim ako stanice imaju metaboličko djelovanje u odnosu na ispitivane kemikalije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti. Potrebno je osigurati da se izbjegava stvaranje uvjeta koji bi mogli dovesti do lažno pozitivnih rezultata koji ne odražavaju genotoksičnost ispitivanih kemikalija. Ti uvjeti mogu biti promjene pH-vrijednosti (41., 42., 43.) ili osmolalnosti, interakciju s hranjivom podlogom za uzgoj stanica (44., 45.) ili previsoke razine citotoksičnosti (vidjeti stavak 29.).

Da bi se mogla analizirati indukcija mikronukleusa, ključno je da dođe do mitoze u tretiranim i netretiranim kulturama. Najviše se podataka za brojenje mikronukleusa dobiva u stanicama koje su dovršile jednu mitozu tijekom ili nakon tretiranja ispitivanom kemikalijom. Za proizvedene nanomaterijale ovu je ispitnu metodu potrebno posebno prilagoditi, ali te prilagodbe nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO ISPITIVANJA

Stanične kulture ljudskog podrijetla ili stanične kulture sisavaca izlažu se ispitivanoj kemikaliji s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega, osim ako se upotrebljavaju stanice s odgovarajućim metaboličkim djelovanjem (vidjeti stavak 19.).

Tijekom ili nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji stanice se uzgajaju onoliko koliko je potrebno da oštećenje kromosoma ili drugi učinci na stanični ciklus / diobu stanica dovedu do nastajanja mikronukleusa u interfaznim stanicama. Za nastanak aneuploidije ispitivana kemikalija obično mora biti prisutna tijekom mitoze. Izdvojene i obojene interfazne stanice analiziraju se na prisutnost mikronukleusa. U idealnom bi slučaju mikronukleuse trebalo pregledati isključivo u stanicama koje su dovršile mitozu tijekom izloženosti ispitivanoj kemikaliji ili u razdoblju nakon izloženosti, ako je takvo razdoblje predviđeno testom. U kulturama koje su tretirane blokatorom citokineze to se lako postiže pregledavanjem isključivo dvojezgrenih stanica. U nedostatku blokatora citokineze važno je na

▼M7

temelju povećanja populacije stanica dokazati da je u analiziranim stanicama vjerojatno došlo do diobe stanica tijekom ili nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Za sve je protokole važno dokazati da je došlo do proliferacije stanica i u kontrolnim i u tretiranim kulturama, a opseg citotoksičnosti ili citostaze uzrokovane ispitivanom kemikalijom potrebno je ispitati u svim kulturama u kojima se pregledavaju mikronukleusi.

OPIS METODE

Stanice

Mogu se upotrijebiti primarne kulture limfocita iz periferne krvi čovjeka ili drugih sisavaca (7., 20., 46., 47.) i određeni broj staničnih linija glodavaca kao što su CHO, V79, CHL/IU te stanice L5178Y ili ljudske stanične linije poput TK6 (19., 20., 21., 22., 23., 26., 27., 28., 29., 31., 33., 34., 35., 36.) (vidjeti stavak 6.). Za ispitivanje mikronukleusa upotrebljavane su i druge stanične linije poput HT29 (48.), Caco-2 (49.), HepaRG (50., 51.), HepG2 (52., 53.), A549 te primarnih embrionalnih stanica sirijskog hrčka (54,) ali one još uvijek nisu opsežno validirane. Stoga je upotrebu tih staničnih linija i vrsta potrebno opravdati na temelju njihove dokazane učinkovitosti u ispitivanju, kako je opisano u odjeljku o kriterijima prihvatljivosti. Zabilježeno je da citohalazin B može utjecati na rast stanica L5178Y pa ga se stoga ne preporučuje upotrebljavati s tom staničnom linijom (23.). Kada se upotrebljavaju primarne stanice, trebalo bi radi dobrobiti životinja razmotriti upotrebu stanica ljudskog podrijetla, ako je to izvedivo, te takve stanice uzorkovati u skladu s etičkim načelima i propisima.

Ljudski limfociti iz periferne krvi trebali bi se dobivati od mladih osoba (otprilike u dobi od 18 do 35 godina) koje su nepušači, ne boluju ni od jedne poznate bolesti i nisu nedavno bile izložene genotoksičnim agensima (npr. kemikalije, ionizirajuće zračenje) u razinama zbog kojih bi moglo doći do povećanja osnovne učestalosti stanica s mikronukleusima. Time bi se osigurala niska i stalna osnovna učestalost stanica s mikronukleusima. Učestalost stanica s mikronukleusima povećava se s dobi te je taj trend izraženiji kod žena nego kod muškaraca (55.). Ako su za uporabu objedinjene stanice više od jednog darivatelja, trebalo bi navesti broj darivatelja. Potrebno je dokazati da je u razdoblju od početka tretiranja ispitivanom kemikalijom do uzorkovanja stanica došlo do diobe stanica. Stanične kulture održavaju se u fazi eksponencijalnog rasta (stanične linije) ili ih se stimulira na diobu (primarne kulture limfocita) kako bi se izložile stanice u različitim fazama staničnog ciklusa jer možda nije poznato koliko su pojedine stanične faze osjetljive na ispitivane kemikalije. Primarne stanice koje treba stimulirati mitogenim agensima kako bi došlo do diobe obično više nisu sinkronizirane tijekom izlaganja ispitivanoj kemikaliji (npr. ljudski limfociti nakon mitogenske stimulacije u trajanju od 48 sati). Ne preporučuje se upotreba sinkroniziranih stanica tijekom tretiranja ispitivanom kemikalijom, ali ona može biti prihvatljiva u opravdanim slučajevima.

Uvjeti koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

Za održavanje kultura trebalo bi upotrebljavati odgovarajuće hranjive podloge za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (posude za kulture, prema potrebi vlažni atmosferski uvjeti s 5 % CO_2, temperatura od 37 °C). Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broja kromosoma staničnih linija te odsutnost kontaminacije mikoplazmom, a stanice ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je došlo promjene u modalnom broju kromosoma. Treba utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa staničnih linija ili primarnih kultura koje se upotrebljavaju u ispitnom laboratoriju i ono treba biti u skladu s objavljenim značajkama stanica.

▼M7

Priprema kultura

Stanične linije: stanice se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju na hranjivu podlogu za uzgoj kulture takvom gustoćom da stanice u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi nastave eksponencijalno rasti do izdvajanja (npr. treba izbjegavati konfluenciju kod stanica koje rastu kao jednoslojna kultura).

Limfociti: puna krv tretirana antikoagulansom (npr. heparinom) ili izolirani limfociti uzgajaju se (npr. tijekom 48 sati ako je riječ o ljudskim limfocitima) u prisutnosti mitogena (npr. fitohemaglutinina (PHA) ako je riječ o ljudskim limfocitima) kako bi se izazvala dioba stanica prije izlaganja ispitivanoj kemikaliji i citohalazinu B.

Metabolička aktivacija

Kada se upotrebljavaju stanice s neodgovarajućom endogenom metaboličkom sposobnošću, potrebno je upotrijebiti egzogene sustave metaboliziranja. Postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9) pripravljena iz jetre glodavaca (obično štakora), koja je bila tretirana sredstvima za enzimsku indukciju, kao što je Aroclor 1254 (56., 57.), ili smjesom fenobarbitala i b-naftoflavona (58., 59., 60.) najčešće je upotrebljavani sustav koji se u pravilu i preporučuje, osim ako je opravdana primjena nekog drugog sustava. Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (61.) i dokazano je da je za nastanak oksidaza s miješanom funkcijom jednako učinkovita kao Aroclor 1254 (58., 59., 60.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 % (v/v), ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Tijekom tretiranja trebalo bi izbjegavati proizvode koji smanjuju mitotski indeks, posebno proizvode koji kompleksiraju kalcij (62.). Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija kemikalija koje se ispituju.

Priprema ispitivane kemikalije

Prije tretiranja stanica krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u odgovarajućim otapalima i prema potrebi razrijediti. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive kemikalije ispituju se nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama (63., 64., 65.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

Uvjeti ispitivanja

Otapala

Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivanih kemikalija, a da ono pri tom nema negativnih učinaka na izvođenje pokusa, tj. ne mijenja rast stanica, ne utječe na cjelovitost ispitivane kemikalije, ne reagira s posudama za uzgoj kultura, ne ugrožava sustav metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili hranjive podloge za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala voda ili dimetil sulfoksid (DMSO). Organska otapala općenito ne bi smjela premašiti 1 % (v/v). Ako se citohalazin B otapa u DMSO-u, ukupna količina organskog otapala upotrijebljenog za ispitivanu kemikaliju i za citohalazin B ne bi smjela premašiti 1 % (v/v); u protivnom je potrebno upotrijebiti netretirane kontrole kako bi se osiguralo da postotak organskog otapala nema štetnih učinaka.

▼M7

Vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi smjela premašiti 10 % (v/v) u konačnom mediju za tretiranje. Upotrebu neuobičajenih otapala (npr. etanola ili acetona) potrebno je opravdati podacima koji govore da su ta otapala kompatibilna s ispitivanom kemikalijom i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. U nedostatku takvih podataka važno je uključiti netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1.) te kontrole s otapalom kako bi se dokazalo da odabrano otapalo ne proizvodi nikakve štetne ili kromosomske učinke (npr. aneuploidiju ili klastogenost).

Upotreba citohalazina B kao blokatora citokineze

Za učinkovitost analize mikronukleusa *in vitro* vrlo je važno osigurati da u stanicama na kojima se izvodi test mitoza bude dovršena tijekom tretiranja ili u razdoblju inkubacije nakon tretiranja, ako je takvo razdoblje predviđeno testom. Brojenje mikronukleusa trebalo bi stoga ograničiti na stanice u kojima je došlo do mitoze tijekom tretiranja ili nakon njega. Citohalazin B je agens koji se najčešće upotrebljava za blokadu citokineze jer sprječava sastavljanje aktina i time onemogućuje odvajanje stanica kćeri nakon mitoze, zbog čega nastaju stanice s dvjema jezgrama (6., 66., 67.). Kada se upotrebljava citohalazin B, istodobno se može mjeriti i učinak ispitivane kemikalije na kinetiku proliferacije stanica. Citohalazin B potrebno je upotrijebiti kao blokatora citokineze kada se upotrebljavaju ljudski limfociti jer se trajanje staničnih ciklusa razlikuje od darivatelja do darivatelja i svi limfociti neće reagirati na stimulaciju fitohemaglutininom. Citohalazin B nije obvezan za druge vrste stanica ako se može utvrditi da je u tim stanicama došlo do diobe kako je opisano u stavku 27. Osim toga, citohalazin B općenito se ne upotrebljava ako se stvaranje mikronukleusa u uzorcima ocjenjuje metodama protočne citometrije.

Laboratorij bi trebao za svaku vrstu stanica odrediti prikladnu koncentraciju citohalazina B za postizanje optimalne učestalosti dvojezgrenih stanica u kontrolnim kulturama s otapalom te dokazati da se njome omogućuje stvaranje dovoljnog broja dvojezgrenih stanica za analizu. Prikladna koncentracija citohalazina B obično je od 3 do 6 μg/ml (19.).

Mjerenje proliferacije stanica i citotoksičnosti te odabir ispitnih koncentracija

Kod određivanja najviše koncentracije ispitivane kemikalije potrebno je izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju pretjeranu citotoksičnost (vidjeti stavak 29.), precipitaciju u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture (vidjeti stavak 30.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 9.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti hranjive podloge, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem konačnog medija za tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.

Proliferacija stanica mjeri se kako bi se osiguralo da je u dovoljnom broju tretiranih stanica došlo do mitoze tijekom ispitivanja te da se stanice tretiraju na odgovarajućim razinama citotoksičnosti (vidjeti stavak 29.). Citotoksičnost bi trebalo utvrditi s metaboličkom aktivacijom i bez nje u glavnom pokusu uz uporabu prikladnih pokazatelja smrti i rasta stanica (vidjeti stavke 26. i 27.). Iako preliminarno ocjenjivanje citotoksičnosti može biti korisno za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrijebiti u glavnom pokusu, takvo ispitivanje nije obvezno. Ako se provede, njime se ne bi trebalo zamijeniti mjerenje citotoksičnosti u glavnom pokusu.

Tretiranje kultura citohalazinom B i mjerenje relativne učestalosti stanica s jednom, dvije ili više jezgri u kulturi precizna je metoda kvantificiranja učinka na proliferaciju stanica i citotoksično ili citostatično djelovanje tretiranja (6.) te se njime osigurava da se mikroskopski pregledaju samo one stanice u kojima je došlo do diobe tijekom ili nakon tretiranja. Preporučuje se izmjeriti indeks proliferacije stanica s blokiranom citokinezom (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) (6., 27., 68.) ili indeks ponavljanja (*Replication Index*, RI) na temelju

▼M7

najmanje 500 stanica po kulturi (vidjeti Dodatak 2. za formule) kako bi se usporedbom vrijednosti dobivenih za tretirane i kontrolne kulture procijenilo citotoksično i citostatično djelovanje tretiranja. Ocjenjivanjem drugih pokazatelja citotoksičnosti (kao što su cjelovitost stanica, apoptoza, nekroza, brojanje stanica u metafazi, stanični ciklus) mogli bi se dobiti korisni podaci, ali to se ocjenjivanje ne smije upotrijebiti kao zamjena za CBPI ili RI.

U istraživanjima u kojima se ne primjenjuje citohalazin B potrebno je dokazati da je u stanicama u kulturi došlo do diobe, tako da je tijekom ili nakon tretiranja ispitivanom kemikalijom kod znatnog udjela stanica koje se pregledavaju došlo do stanične diobe jer se u suprotnome mogu dobiti lažno negativni rezultati. Za procjenu citotoksičnog i citostatičnog djelovanja tretiranja preporučuje se izmjeriti relativno udvostručenje populacije (*Relative Population Doubling*, RPD) ili relativno povećanje broja stanica (engl. *Relative Increase in Cell Count*, RICC) (17., 68., 69., 70., 71.) (vidjeti Dodatak 2. za formule). Kada se primjenjuju produljena vremena uzorkovanja (npr. ako razdoblje tretiranja odgovara duljini od 1,5 do 2 normalna stanična ciklusa, a izdvajanje se provodi po isteku dodatnog razdoblja koje odgovara duljini od 1,5 do 2 normalna stanična ciklusa, što dovodi do uzorkovanja s vremenskim odmakom duljim od 3 do 4 normalna stanična ciklusa kako je opisano u stavcima 38. i 39.) može se dogoditi da se RPD-om podcijeni citotoksičnost (71.). U tim bi okolnostima RICC mogao biti bolja mjera, ali bi i ocjena citotoksičnosti nakon 1,5 do 2 normalna stanična ciklusa bila korisna procjena. Ocjenjivanjem drugih pokazatelja citotoksičnosti ili citostaze (kao što su cjelovitost stanica, apoptoza, nekroza, brojanje stanica u metafazi, indeks proliferacije (PI), stanični ciklus, nukleoplazmatski mostovi ili nuklearni pupovi) mogli bi se dobiti korisni dodatni podaci, ali to se ocjenjivanje ne smije upotrijebiti kao zamjena za RPD ili RICC.

Potrebno je ocijeniti najmanje tri ispitne koncentracije (ne uključujući otapalo i pozitivne kontrole) koje ispunjuju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Neovisno o vrsti stanica (stanične linije ili primarne kulture limfocita) za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Iako se preporučuje upotreba dviju usporednih kultura, prihvatljiva je i upotreba jedne kulture pod uvjetom da se pregleda jednak ukupni broj stanica neovisno o tome je li riječ o jednoj kulturi ili dvjema usporednim kulturama. Upotreba jedne kulture posebno je relevantna kada se ocjenjuje više od tri koncentracije (vidjeti stavke 44. – 45.). Rezultati dobiveni iz neovisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji mogu se objediniti radi analize podataka. Za ispitivane kemikalije za koje je dokazana mala citotoksičnost ili nepostojanje citotoksičnosti uobičajeno će biti prikladne koncentracije u dva do tri intervala. Ako se pojavi citotoksičnost, odabranim bi ispitnim koncentracijama trebalo obuhvatiti raspon od one koja uzrokuje citotoksičnost kako je opisano u stavku 29. te uključiti koncentracije pri kojima se javlja umjerena citotoksičnost i one pri kojima je citotoksičnost mala ili je nema. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za dobivanje podataka pri niskoj ili umjerenoj citotoksičnosti ili za detaljno istraživanje odnosa između doze i odgovora biti potrebno upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i/ili više od tri koncentracije (za jednu ili ponovljene kulture), posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 60.).

Ako se najviša koncentracija temelji na citotoksičnosti, najjača bi koncentracija trebala proizvesti 55 ± 5 % citotoksičnosti prema preporučenim parametrima citotoksičnosti (tj. smanjenje RICC-a i RPD-a za stanične linije kada se ne upotrebljava citohalazin B te smanjenje CBPI-ja ili RI-ja kada se upotrebljava citohalazin B na 45 ± 5 % istodobne negativne kontrole) (72.). Trebalo bi s oprezom tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo u gornjem dijelu navedenog raspona citoksičnosti od 55 ± 5 % (71.).

▼M7

Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost javlja pri koncentracijama koje su više od najniže koncentracije pri kojoj tvar nije topljiva, preporučuje se provesti ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja izaziva zamućenost ili vidljivi talog jer se mogu pojaviti lažni rezultati kao posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utječe na izvođenje ispitivanja (npr. bojenje ili brojenje). Može biti korisno odrediti topljivost u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.

Ako se ne opazi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi iznositi 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml, ovisno o tome što je manje (73., 74., 75.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (UVCB) (76.), proizvodima ekstrahiranima iz okoliša itd., može biti potrebno povećati najvišu koncentraciju (npr. na 5 mg/ml), u nedostatku dovoljne citotoksičnosti, kako bi se povećala koncentracija svakog od sastojaka. Međutim, potrebno je naglasiti da navedeni zahtjevi mogu biti drukčiji za lijekove za ljudsku uporabu (93.).

Kontrole

Kod svakog izdvajanja stanica potrebno je uključiti i istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 21.) koje se sastoje samo od otapala u hranjivoj podlozi za tretiranje i tretirane su na jednak način kao i kulture.

Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija da identificira klastogene i aneugene tvari u uvjetima ispitnog protokola te za dokazivanje učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije (kada je primjenjivo). Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne kemikalije koje se upotrebljavaju kao pozitivna kontrola.

Trenutačno nisu poznati aneugeni koji za svoje genotoksično djelovanje zahtijevaju aktivaciju metabolizma (17.). S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano za kratkotrajna tretiranja koja se istodobno provode s metaboličkom aktivacijom i bez nje uz isto trajanje tretiranja, upotreba pozitivnih kontrola može se ograničiti na klastogene tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju jedan klastogeni odgovor u pozitivnoj kontroli dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Međutim, dugotrajno tretiranje (bez S9) trebalo bi imati vlastitu pozitivnu kontrolu s obzirom na to da je trajanje tretiranja drukčije nego kod ispitivanja u kojemu se upotrebljava metabolička aktivacija. Ako se odabere klastogen kao jedina pozitivna kontrola za kratkotrajno tretiranje s metaboličkom aktivacijom i bez nje, za dugotrajno tretiranje s metaboličkom aktivacijom trebalo bi odabrati aneugen. Pozitivne kontrole i za klastogenost i za aneugenost trebalo bi upotrebljavati za metabolički kompetentne stanice koje ne zahtijevaju S9.

Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava (tj. učinci su jasni, ali identitet kodiranih predmetnih stakalaca nije odmah očit osobi koja ih očitava), a odgovor ne bi trebalo dovesti u pitanje citotoksičnošću koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ispitnoj metodi.

▼M7

Tablica 1.

Preporučene referentne kemikalije za procjenu osposobljenosti laboratorija i odabir pozitivnih kontrola

Kategorija	Kemikalija	CAS br.
1. **Klastogeni aktivni bez metaboličke aktivacije**		
	Metil metansulfonat	66-27-3
	Mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oksid	56-57-5
	Citozin arabinozid	147-94-4
2. **Klastogeni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju**		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciklofosfamid	50-18-0
3. **Aneugeni**		
	Kolhicin	64-86-8
	Vinblastin	143-67-9

POSTUPAK

Plan tretiranja

Kako bi vjerojatnost otkrivanja aneugenih ili klastogenih tvari koje djeluju u određenoj fazi staničnog ciklusa bila što veća, važno je da u svim fazama njihovih staničnih ciklusa dovoljan broj stanica bude tretiran ispitivanom kemikalijom. Sva bi tretiranja trebala započeti i završiti tijekom eksponencijalnog rasta stanica, koje bi trebale nastaviti rasti sve do uzorkovanja. Raspored tretiranja staničnih linija i primarnih staničnih kultura stoga se do određene mjere može razlikovati od onoga za limfocite koji zahtijevaju mitogensku stimulaciju za započinjanje staničnog ciklusa (17.). Najučinkovitiji pristup za limfocite je započeti s izlaganjem ispitivanoj tvari 44 do 48 sati nakon stimulacije PHA-om, kada su diobe stanica asinkrone (6.).

Objavljeni podaci (19.) pokazuju da se većina aneugena i klastogena otkriva kratkotrajnim tretiranjem u trajanju od tri do šest sati u prisutnosti i odsutnosti S9 nakon čega se ispitivana kemikalija uklanja te se uzorkovanje provodi po isteku razdoblja koje otprilike odgovara trajanju od 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa nakon početka tretiranja (7.).

Međutim, za temeljitu procjenu, koja će biti potrebna za donošenje zaključka o negativnom ishodu, potrebno je primijeniti sva tri sljedeća pokusna uvjeta primjenom kratkotrajnog tretiranja s metaboličkom aktivacijom i bez nje te dugotrajnog tretiranja bez metaboličke aktivacije (vidjeti stavke 56., 57. i 58.):

— stanice je potrebno izlagati ispitivanoj kemikaliji bez metaboličke aktivacije od tri do šest sati te ih uzorkovati po isteku razdoblja koje otprilike odgovara trajanju od 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa nakon početka tretiranja (19.),

— stanice je potrebno izlagati ispitivanoj kemikaliji s metaboličkom aktivacijom od tri do šest sati te ih uzorkovati po isteku razdoblja koje otprilike odgovara trajanju od 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa nakon početka tretiranja (19.),

▼M7

— stanice je potrebno neprestano izlagati bez metaboličke aktivacije sve do uzorkovanja po isteku razdoblja koje otprilike odgovara trajanju 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa.

Ako bilo koji od gore navedenih pokusnih uvjeta dovede to pozitivnog odgovora, možda neće biti potrebno istražiti ni jedan drugi postupak tretiranja.

Ako je poznato da ispitivana kemikalija utječe na duljinu staničnog ciklusa ili se na to sumnja (npr. pri ispitivanju analognih nukleozida), posebno za stanice kompetentne u pogledu p53 (35., 36., 77.), uzorkovanje ili obnavljanje može se produljiti za dodatno razdoblje koje odgovara trajanju od 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa (tj. ukupno od 3,0 do 4,0 stanična ciklusa nakon početka kratkotrajnih i dugotrajnih tretiranja). Navedene se mogućnosti odnose na situacije koje mogu biti zabrinjavajuće zbog mogućih interakcija između ispitivane kemikalije i citohalazina B. Kada se primjenjuju produljena vremena uzorkovanja (tj. uzgoj kulture u trajanju od 3,0 do 4,0 stanična ciklusa), potrebno je voditi računa o tome da se u stanicama i dalje aktivno odvija dioba. Primjerice, kod limfocita eksponencijalni rast može početi opadati 96 sati nakon stimulacije te jednoslojne kulture stanica mogu postati konfluentne.

Predloženi rasporedi tretiranja stanica sažeto su navedeni u tablici 2. Ti se opći rasporedi tretiranja mogu izmijeniti (pri čemu izmjena mora biti opravdana) ovisno o stabilnosti ili reaktivnosti ispitivane kemikalije ili posebnim značajkama rasta upotrijebljenih stanica.

Tablica 2.

Razdoblja tretiranja i izdvajanja stanica za *in vitro* mikronukleus-test

Limfociti, primarne stanice i stanične linije tretirane primjenom citohalazina B	+ S9 Kratkotrajno tretiranje	Tretirati od tri do šest sati u prisutnosti S9; ukloniti S9 i hranjivu podlogu u kojoj je izvršeno tretiranje; dodati svježu podlogu i citohalazin B; izdvojiti stanice nakon 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa nakon početka tretiranja.
	– S9 Kratkotrajno tretiranje	Tretirati od tri do šest sati; ukloniti hranjivu podlogu u kojoj je izvršeno tretiranje; dodati svježu podlogu i citohalazin B; izdvojiti stanice nakon 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa nakon početka tretiranja.
	– S9 Produljeno tretiranje	Tretirati u trajanju od 1,5 do 2 normalna stanična ciklusa u prisutnosti citohalazina B; izdvojiti stanice na kraju razdoblja tretiranja.
Stanične linije tretirane bez primjene citohalazina B (identično prethodno navedenim rasporedima tretiranja, ali bez dodavanja citohalazina B)		

Na kraju tretiranja u trajanju od tri do šest sati u jednoslojnim kulturama mogu biti prisutne mitotičke stanice (prepoznatljive po tome što su okrugle i odvajaju se od površine). Budući da se te mitotičke stanice lako odvajaju, mogu se izgubiti pri odstranjivanju podloge s ispitivanom kemikalijom. Ako postoji dokaz o znatnom povećanju broja mitotičkih stanica u odnosu na kontrole, čime se ukazuje na vjerojatno zaustavljanje mitoze, te stanice trebalo bi prikupiti centrifugiranjem i ponovno dodati kulturama kako bi se u trenutku izdvajanja stanica izbjegao gubitak stanica koje se nalaze u fazi mitoze i kojima prijeti opasnost od mikronukleusa / kromosomskih aberacija.

▼M7

Izdvajanje stanica i priprema predmetnih stakalaca

Svaka se kultura izdvaja i obrađuje zasebno. Priprema stanica može uključiti hipotonično tretiranje, iako taj korak nije potreban ako se na drugi način može ostvariti primjereno širenje stanica. Za pripremu stakalca mogu se upotrijebiti različite tehnike, pod uvjetom da se za pregled dobiju visokokvalitetni preparati sa stanicama. Potrebno je zadržati stanice koje imaju netaknutu staničnu membranu i netaknutu citoplazmu kako bi se omogućilo otkrivanje mikronukleusa i (u metodi blokirane citokineze) pouzdana identifikacija dvojezgrenih stanica.

Stakalca se mogu obojiti različitim metodama, kao što su metoda po Giemsi ili s pomoću fluorescentnih bojila specifičnih za DNK. Upotrebom odgovarajućih fluorescentnih bojila (npr. akridin oranž (78.) ili Hoechst 33258 plus pironin-Y (79.)) može se spriječiti stvaranje nekih od artefakta koji se povezuju s upotrebom bojila koja nisu specifična za DNK. Antikinetohorna protutijela, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) pancentromernim sondama DNK ili primarno označivanje *in situ* početnicama specifičnima za centromere zajedno s odgovarajućim kontrastnim bojenjem DNK mogu se primijeniti za određivanje sadržaja mikronukleusa (čitavi kromosomi bit će obojeni, a acentrični kromosomski fragmenti neće) ako se žele dobiti mehanističke informacije o njihovu nastajanju (16., 17.). Za razlikovanje klastogenih i aneugenih tvari mogu se primijeniti i druge metode, ako su dokazano učinkovite i validirane. Primjerice, za određene se stanične linije korisne informacije mogu dobiti mjerenjem jezgri sub-2N kao hipodiploidnih događaja primjenom tehnika poput analize slike, laserske skenirajuće citometrije ili protočne citometrije (80., 81., 82.). Morfološka zapažanja na jezgrama mogla bi isto tako upućivati na moguću aneuploidiju. Osim toga, ispitivanje aberacija metafaznih kromosoma, provedeno po mogućnosti na istoj vrsti stanice i u skladu s protokolom usporedive osjetljivosti, moglo bi isto tako biti koristan način određivanja nastaju li mikronukleusi zbog loma kromosoma (znajući da gubitak kromosoma ne bi bio otkriven testom kromosomske aberacije).

Analiza

Sva predmetna stakalca, uključujući ona s otapalom te netretiranim (ako su upotrijebljene) i pozitivnim kontrolama, potrebno je pojedinačno kodirati prije mikroskopske analize učestalosti mikronukleusa. Kad se primjenjuju automatski sustavi za brojenje, na primjer protočna citometrija, laserska skenirajuća citometrija ili slikovna analiza, trebalo bi primijeniti odgovarajuće tehnike za kontrolu mogućeg utjecaja ili pomaka. Bez obzira na to koja se automatska platforma upotrebljava za brojenje mikronukleusa, potrebno je istodobno procijeniti CBPI, RI, RPD i RICC.

Kod kultura tretiranih citohalazinom B učestalost mikronukleusa potrebno je analizirati na najmanje 2 000 dvojezgrenih stanica po koncentraciji i kontroli (83.), jednakomjerno raspodijeljenih na ponovljenim uzorcima, ako se oni upotrebljavaju. Ako se za svaku koncentraciju upotrebljava samo jedna kultura (vidjeti stavak 28.), potrebno je pregledati najmanje 2 000 dvojezgrenih stanica po kulturi (83.). Ako je za pregled pri svakoj koncentraciji dostupno znatno manje od 1 000 dvojezgrenih stanica po kulturi (u slučaju dviju usporednih kultura) ili 2 000 dvojezgrenih stanica (ako se upotrebljava jedna kultura) te ako nije utvrđeno značajno povećanje mikronukleusa, test je potrebno ponoviti na većem broju stanica ili pri manje citotoksičnim koncentracijama, ovisno o tome što je primjerenije. Potrebno je paziti da se ne ocjenjuju dvojezgrene stanice nepravilnog oblika ili kod kojih postoji velika razlika u veličini dviju jezgri. Osim toga, dvojezgrene stanice ne smiju se zamijeniti sa slabo raširenim višejezgrenim stanicama. Stanice koje imaju više od dviju glavnih jezgri ne

▼M7

analiziraju se na mikronukleuse jer osnovna učestalost mikronukleusa u tim stanicama može biti veća (84.). Pregledavanje jednojezgrenih stanica prihvatljivo je ako se pokazalo da ispitivana kemikalija utječe na djelovanje citohalazina B. U takvim bi slučajevima moglo biti korisno ponoviti test bez citohalazina B. Pregledavanjem i jednojezgrenih stanica uz dvojezgrene mogle bi se dobiti korisne informacije (85., 86.), ali ono nije obvezno.

Kod staničnih linija koje se ispituju bez tretiranja citohalazinom B mikronukleuse bi trebalo brojiti u najmanje 2 000 stanica po ispitnoj koncentraciji i kontroli (83.), jednakomjerno raspodijeljenih na ponovljenim uzorcima, ako se oni upotrebljavaju. Ako se za svaku koncentraciju upotrebljava samo jedna kultura (vidjeti stavak 28.), potrebno je pregledati najmanje 2 000 stanica po kulturi. Ako je za pregled pri svakoj koncentraciji dostupno znatno manje od 1 000 stanica po kulturi (u slučaju dviju usporednih kultura) ili 2 000 stanica (ako se upotrebljava jedna kultura) te ako nije utvrđeno znatno povećanje mikronukleusa, test je potrebno ponoviti na većem broju stanica ili pri manje citotoksičnim koncentracijama, ovisno o tome što je primjerenije.

Ako se upotrebljava citohalazin B, potrebno je utvrditi CBPI ili RI kako bi se procijenila proliferacija stanica (vidjeti Dodatak 2.), upotrebljavajući pri tom najmanje 500 stanica po kulturi. Ako se tretiranje izvodi bez dodanog citohalazina B, ključno je dostaviti dokaz da je došlo do diobe stanica u kulturi, kako je objašnjeno u stavcima od 24. do 28.

Osposobljenost laboratorija

Kako bi stekao dovoljno iskustva u izvođenju testa prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim kemikalijama koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna s metaboličkom aktivacijom i jedna bez metaboličke aktivacije te jedna putem aneugenog mehanizma, izabrane s popisa kemikalija iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (uključujući netretirane kulture i različita otapala/nosače). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. To se ne primjenjuje na laboratorije koji već imaju iskustva, tj. one koji imaju bazu podataka o prijašnjim ispitivanjima kako je utvrđeno u stavcima od 49. do 52.

Odabrane kemikalije koje se upotrebljavaju kao pozitivna kontrola (vidjeti tablicu 1.) potrebno je ispitati u okviru kratkotrajnih i dugotrajnih tretiranja u odsutnosti metaboličke aktivacije te u okviru kratkotrajnog tretiranja u prisutnosti metaboličke aktivacije kako bi se pokazala osposobljenost za otkrivanje klastogenih i aneugenih kemikalija, dokazala djelotvornost sustava metaboličke aktivacije te primjerenost postupaka pregledavanja (vizualna mikroskopska analiza, protočna citometrija, laserska skenirajuća citometrija ili analiza slike). Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih kemikalija pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

Laboratorij bi trebao uspostaviti:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).

Pri prvom bi dobivanju podataka radi uspostave baze podataka o raspodjeli prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim kontrolama, ako postoje. Kako se budu dodavali novi podaci o raspodjeli kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te raspodjele (87., 88.). Laboratorij bi svoju bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama prvo trebao uspostaviti na temelju najmanje deset pokusa, iako se preporučuje da se ona temelji na najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode kontrole kvalitete, kao što su

▼M7

kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami (*C-charts*) ili X-stupčasti dijagrami (*X-bar charts*) (88.)), kako bi utvrdili varijabilnost svojih podataka o pozitivnim i negativnim kontrolama te pokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (83.). Dodatne preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prijašnje podatke (tj. kriteriji prema kojima se podaci uključuju u bazu o prijašnjim podacima te isključuju iz nje, kao i kriteriji prihvatljivosti za određeni pokus) dostupne su u literaturi (87.).

Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to jesu li podaci u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti stanica s mikronukleusima u jednoj kulturi ili u skupu ponovljenih kultura kako je opisano u stavku 28. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % raspodjele prijašnjih podataka o negativnim kontrolama koji se nalaze u bazi podataka laboratorija (87., 88.). Ako se podaci o istodobnim negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u bazu povijesnih podataka o raspodjeli pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 50.) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

PREDSTAVLJANJE REZULTATA

Ako se primjenjuje tehnika blokiranja citokineze, za ocjenjivanje indukcije mikronukleusa uzima se u obzir isključivo učestalost dvojezgrenih stanica s mikronukleusima (bez obzira na broj mikronukleusa po stanici). O pregledavanju stanica s jednim, dvama ili više mikronukleusa može se odvojeno izvijestiti te iako se tako mogu dobiti korisne informacije, to nije obvezno.

Potrebno je izvršiti istodobna mjerenja citotoksičnosti i/ili citostaze za sve tretirane kulture te pozitivne i negativne kontrole (16.). Za sve tretirane i kontrolne kulture potrebno je izračunati CBPI ili RI kako bi se izmjerilo kašnjenje staničnog ciklusa ako se primjenjuje metoda blokirane citokineze. U odsutnosti citohalazina B mjeri se RPD ili RICC (vidjeti Dodatak 2.).

Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tablice.

Kriteriji prihvatljivosti

Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:

— istodobna negativna kontrola smatra se prihvatljivom za dodavanje u bazu podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama kako je opisano u stavku 50.,

— istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 50.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s onima koji su dobiveni u bazi podataka laboratorija o prijašnjim pozitivnim kontrolama te uzrokovati statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,

— trebali bi biti ispunjeni kriteriji proliferacije stanica u kontroli s otapalom (stavci 25. – 27.),

— ispitani su svi pokusni uvjeti, osim ako su u jednom od njih dobiveni pozitivni rezultati (stavci 36. – 40.),

— moguće je analizirati odgovarajući broj stanica i koncentracija (stavak 28. i stavci 44. – 46.),

▼M7

— kriteriji za odabir najveće koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 24. – 31.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

Pod uvjetom da su svi kriteriji prihvatljivosti ispunjeni, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako u bilo kojem ispitanom pokusnom uvjetu (vidjeti stavke 36. – 39.):

— najmanje jedna od ispitnih koncentracija pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom (89.),

— odgovarajući test trenda pokaže da je u najmanje jednom pokusnom uvjetu povećanje povezano s dozom (vidjeti stavak 28.),

— bilo koji od rezultata nalazi se izvan raspona distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 52.).

Ako su svi navedeni kriteriji ispunjeni, smatra se da ispitivana kemikalija može uzrokovati lomove i/ili povećanje ili gubitak kromosoma u tom ispitnom sustavu. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (90., 91., 92.).

Pod uvjetom da su svi kriteriji prihvatljivosti ispunjeni, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima (vidjeti stavke 36. – 39.):

— ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— nema povećanja povezanog s koncentracijom pri ocjenjivanju prikladnim testom trenda,

— svi se rezultati nalaze unutar raspona distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 52.).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može uzrokovati lomove i/ili povećanje ili gubitak kromosoma u tom ispitnom sustavu. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (90., 91., 92.).

Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

U slučaju kada reakcija nije ni jasno negativna niti jasno pozitivna kako je prethodno opisano i/ili kako bi se utvrdila biološka relevantnost rezultata, podatke bi trebalo ocijeniti stručnom prosudbom i/ili dodatnim istraživanjima. Moglo bi biti korisno pregledati dodatne stanice (prema potrebi) ili ponoviti pokus u eventualno izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija, drugi uvjeti metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9)).

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

U *in vitro* mikronukleus-testu ispitivane kemikalije mogu inducirati mikronukleuse zato što uzrokuju lom kromosoma, gubitak kromosoma ili kombinaciju tih dviju pojava. Kako bi se odredilo je li mehanizam indukcije mikronukleusa posljedica klastogenog i/ili aneugenog djelovanja, mogu se provesti dodatne analize primjenom antikinetohornih protutijela, *in situ* sondi specifičnih za centromere ili drugih metoda.

▼M7

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— reaktivnost ispitivanih kemikalija s otapalom/nosačem ili hranjivom podlogom za uzgoj stanica,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako je poznata,

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Jednokomponentna tvar:

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Višekomponentne tvari, UVCB tvari i smjese:

— opisane koliko god je to moguće kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka.

Otapalo:

— obrazloženje odabira nosača,

— postotak nosača u konačnoj hranjivoj podlozi za uzgoj kulture.

Stanice:

— vrsta i podrijetlo upotrijebljenih stanica,

— prikladnost upotrijebljene vrste stanice,

— odsutnost mikoplazme, u slučaju staničnih linija,

— za stanične linije, informacije o duljini staničnog ciklusa ili indeksu proliferacije,

— ako su upotrijebljeni limfociti, spol darivatelja krvi, dob i sve bitne informacije o darivatelju, punoj krvi ili izoliranim limfocitima, upotrijebljenom mitogenu;

— normalno trajanje staničnog ciklusa (negativna kontrola),

— ako je dostupan, broj pasaža za stanične linije,

— metode održavanja staničnih kultura, za stanične linije,

— modalni broj kromosoma, za stanične linije.

▼M7

Ispitni uvjeti:

— identitet tvari koja blokira citokinezu (npr. citohalazin B), ako je upotrijebljena, njezina koncentracija i trajanje izloženosti stanice,

— koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/mL, ili mM hranjive podloge),

— obrazloženje za odabir koncentracija i broja kultura, uključujući podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,

— sastav hranjivih podloga, koncentracija CO_2, ako je primjenjivo, stupanj vlažnosti,

— koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemijske tvari dodane u hranjivu podlogu za uzgoj kulture,

— temperatura i vrijeme inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— izdvajanje nakon tretiranja,

— gustoća stanica kod nasađivanja, ako je primjenjivo,

— vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije, izvor S9, metoda pripreme smjese S9, koncentracija ili volumen mješavina S9 i samog S9 u konačnoj hranjivoj podlozi za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9 (npr. enzimsko djelovanje, sterilnost, metabolička sposobnost),

— kemikalije pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije, uvjeti i trajanja razdoblja tretiranja i obnavljanja,

— metode pripreme predmetnih stakalaca i primijenjene tehnike bojenja,

— kriteriji za pregledavanje stanica s mikronukleusima (odabir stanica koje se mogu analizirati te identifikacija mikronukleusa),

— broj analiziranih stanica,

— metode mjerenja citotoksičnosti,

— sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,

— kriteriji u skladu s kojima se studiju smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom,

— upotrijebljena metoda (upotrijebljene metode) statističke analize,

— metode, kao što su uporaba antikinetohornih antitijela ili sonda specifičnih za centromere, kojima se određuje sadržavaju li mikronukleusi čitave ili fragmentirane kromosome, ako je to primjenjivo,

— metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

— definicija stanica prihvatljivih za analizu,

— u odsutnosti citohalazina B, broj tretiranih stanica i broj izdvojenih stanica za svaku kulturu u slučaju staničnih linija,

▼M7

— upotrijebljena metoda mjerenja citotoksičnosti, npr. CBPI ili RI u slučaju metode blokirane citokineze; RICC ili RPD ako nisu primijenjene metode blokirane citokineze; druga zapažanja, ako postoje (npr. konfluencija stanica, aptoza, nekroza, brojanje stanica u metafazi, učestalost dvojezgrenih stanica),

— znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,

— podaci o pH i osmolalnosti podloge za tretiranje, ako su utvrđeni,

— raspodjela jednojezgrenih, dvojezgrenih i višejezgrenih stanica ako je primijenjena metoda blokirane citokineze,

— broj stanica s mikronukleusima, koji se navodi odvojeno za svaku tretiranu i kontrolnu kulturu, i određivanje jesu li iz dvojezgrenih ili jednojezgrenih stanica, prema potrebi,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),

— podaci o prijašnjim negativnim kontrolama (s otapalom) i prijašnjim pozitivnim kontrolama, zajedno s rasponima, prosjecima i standardnom devijacijom te kontrolnim granicama od 95 % za distribuciju, kao i broj podataka,

— statistička analiza, vrijednosti p, ako postoje.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2. Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, str. 1.–4.

3. Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, str. 3.–15.

4. Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, str. 233.–246.

5. Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, str. 167.–172.

6. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, str. 1084.–1104.

7. Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, str. 193.–198.

8. Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, str. 34-43.

▼M7

9. Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, str. 9.–20.

10. Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, str. 297.–302.

11. Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, str. 329.–334.

12. Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, str. 205–213.

13. Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, str. 519–525.

14. Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, str. 9.–20.

15. Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, str. 233.–245.

16. Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211–219.

17. Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, str. 153.–163.

18. Poglavlje B.10. ovog Priloga*:* In vitro test kromosomskih aberacija kod sisavaca.

19. Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 13.–36.

20. Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 37.–60.

21. Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 61.–87.

22. Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 88.–124.

23. Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 125.–152.

24. Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, str. 187.–208.

25. Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, str. 45.–59.

▼**M7**

26. Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, str. 81.–116.

27. Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, str. 183.–190.

28. Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, str. 55.–71.

29. von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, str. 137.–163.

30. Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, str. 123.–134.

31. Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, str. 569.–580.

32. Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, str. 1.–152.

33. Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, str. 139.–147.

34. Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, str. 28.–36.

35. Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, str. 373.–384.

36. Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, str. 105.–115.

37. ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25. sastanak ESAC-a, 16. – 17. studenoga 2006., dostupno na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

38. ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Dostupno na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

39. Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, str. 271.–283.

40. ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

41. Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, str. 147.–205.

42. Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, str. 297.–305.

43. Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, str. 789.–886.

44. Long, L.H. *et al*. (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 Research,* Vol. 634/1–2, str. 177.–183.

45. Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, str. 439.–452.

46. Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, str. 29.–36.

47. Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, str. 11.–18.

48. Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, str. 825.–840.

49. Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, str. 251.–259.

50. Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, str. 555.–560.

51. Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, str. 295.–304.

52. Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, str. 257.–260.

53. Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, str. 315.–328.

54. Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1–2, str. 61.–70.

55. Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, str. 31.–45.

56. Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, str. 173.–215.

57. 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. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, str. 55.–65.

▼M7

58. Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, str. 175.–177.

59. Matsushima, T. *et al*. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.

60. Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, str. 51.–59.

61. UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupno na: http://www.pops.int/

62. Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, str. 225–8.

63. Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, str. 91.–103.

64. Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, str. 795.–801.

65. Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, str. 122.–130.

66. Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, str. 35.–44.

67. Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, str. 103.–112.

68. Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, 97–100.

69. Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, str. 1.–3.

70. Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, str. 169.–184.

71. Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, str. 86.–87.

72. Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, str. 101.–107.

73. OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Dostupno na zahtjev.

▼M7

74. Morita T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research*, Vol. 741, str. 32.–56.

75. Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, str. 36–43.

76. EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

77. Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, str. 29.–34.

78. Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, str. 241.–247.

79. MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, str. 269.–275.

80. Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, str. 280.–286.

81. Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, str. 355.–362.

82. Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, str. 33.–40.

83. OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

84. Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, str. 65.–75.

85. Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, str. 193–8.

86. Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, str. 873–99.

87. Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, str. 87.–90.

88. Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

89. Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, str. 463.–467.

90. Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

91. Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, str. 1.–175.

▼**M7**

92. Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, str. 141.–154.

93. International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneugen: svaka kemikalija ili postupak koji u interakciji s elementima mitotičkog i mejotičkog ciklusa diobe stanice uzrokuje aneuploidiju u stanicama ili organizmima.

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne u cijeloj skupini ili skupinama kromosoma (poliploidija).

Apoptoza: programirana smrt stanice koju obilježava niz koraka koji vode do razgradnje stanica u čestice vezane na membranu koje se potom eliminiraju fagocitozom ili rasipanjem.

Proliferacija stanica: povećanje broja stanica kao posljedica mitotičke diobe stanice.

Centromera: DNK sekvenca kromosoma gdje su spojene obje kromatide i na kojoj su na obje strane pričvršćena oba kinetohora.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Koncentracije: odnosi se na konačne koncentracije ispitivane kemikalije u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture.

Klastogen: svaka kemikalija ili događaj koji uzrokuje strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili eukariotskim organizmima.

Citokineza: proces diobe stanice koji slijedi neposredno nakon mitoze i kojim nastaju dvije stanice kćeri od kojih svaka sadržava jednu jezgru.

Indeks proliferacije s blokiranom citokinezom (CBPI): udio stanica u fazi druge diobe u tretiranoj populaciji u odnosu na netretiranu kontrolu (vidjeti Dodatak 2. za formulu).

Citostaza: sprječavanje rasta stanica (vidjeti Dodatak 2. za formulu).

Citotoksičnost: za analize obuhvaćene ovom ispitnom metodom koje se provode u prisutnosti citohalazina B citotoksičnost se definira kao smanjenje indeksa proliferacije stanica s blokiranom citokinezom (CBPI) ili indeksa ponavljanja (RI) tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti stavak 26. i Dodatak 2.).

Za ispitivanja obuhvaćena ovom ispitnom metodom koja se provode u odsutnosti citohalazina B citotoksičnost se definira kao smanjenje relativnog udvostručenja populacije (RPD) ili relativnog povećanja broja stanica (RICC) kod tretiranih stanica u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavak 27. i Dodatak 2.).

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

Interfazne stanice: stanice koje nisu u fazi mitoze.

Kinetohor: proteinska struktura koja nastaje na centromeri kromosoma na koju se tijekom diobe stanice prihvaćaju niti diobenog vretena, čime se omogućuje pravilno kretanje kromosoma kćeri prema polovima stanica kćeri.

▼M7

Mikronukleusi: maleni nukleusi koji se nalaze uz glavne stanične jezgre i od njih su odvojeni i koji nastaju tijekom telofaze mitoze ili mejoze iz zaostalih fragmenata kromosoma ili čitavih kromosoma.

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

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

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

Nerazdvajanje: nemogućnost para kromatida da se razdvoji i pravilno odvoji u razvijajuće stanice kćeri, zbog čega nastaju stanice kćeri s neuobičajenim brojem kromosoma.

Status proteina p53: protein p53 sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi i popravku DNK. Stanice kojima nedostaje funkcionalan protein p53, koje nisu u mogućnosti zaustaviti stanični ciklus ili ukloniti oštećene stanice putem apoptoze ili drugih mehanizama (npr. indukcijom popravka DNK) povezanih s funkcijama proteina p53 kao odgovorima na oštećenje DNK, teoretski bi trebale biti podložnije genskim mutacijama ili kromosomskim aberacijama.

Poliploidija: brojčane kromosomske aberacije u stanicama ili organizmima koje zahvaćaju cijeli skup (skupove) kromosoma, a ne jedan ili više pojedinačnih kromosoma (aneuploidija).

Indeks proliferacije (PI): metoda mjerenja citotoksičnosti kada se ne upotrebljava citohalazin B (formula je navedena u Dodatku 2.).

Relativno povećanje broja stanica (RICC): metoda mjerenja citotoksičnosti kada se ne upotrebljava citohalazin B (formula je navedena u Dodatku 2.).

Relativno udvostručenje populacije (RPD): metoda mjerenja citotoksičnosti kada se ne upotrebljava citohalazin B (formula je navedena u Dodatku 2.).

Indeks ponavljanja (RI): udio dovršenih ciklusa stanične diobe u tretiranoj kulturi u odnosu na netretiranu kulturu, tijekom razdoblja izloženosti i obnavljanja (formula je navedena u Dodatku 2.).

Frakcija jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. sirovi ekstrakt jetre.

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

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

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

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

▼M7

Dodatak 2.

FORMULE ZA OCJENJIVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Kada se upotrebljava citohalazin B, ocjenu citotoksičnosti trebalo bi temeljiti na **indeksu proliferacije s blokiranom citokinezom (CBPI)** ili **indeksu ponavljanja (RI)** (17., 69.). CBPI pokazuje prosječan broj jezgri po stanici te se može upotrijebiti za izračunavanje proliferacije stanica. RI pokazuje relativan broj staničnih ciklusa po stanici tijekom razdoblja izloženosti citohalazinu B u tretiranim kulturama u usporedbi s kontrolnim kulturama te se može upotrijebiti za izračunavanje postotka citostaze:

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

i:

T = kultura tretirana ispitivanom kemikalijom

C = kontrolna kultura

pri čemu je:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{br.jednojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{br.dvojezgrenih stanica}) + (3 \times \text{br.višejezgrenih stanica}))}{(\text{ukupni broj stanica})}$$

Stoga, CBPI koji iznosi 1 (sve su stanice jednojezgrene) odgovara citostazi od 100 %.

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

$$\text{RI} = \frac{((\text{br.dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{br.višejezgrenih stanica}))/(\text{ukupni broj stanica})_T}{((\text{br.dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{br.višejezgrenih stanica}))/(\text{ukupni broj stanica})_C} \times 100$$

T = tretirane kulture

C = kontrolne kulture

Stoga, RI od 53 % znači da se, u usporedbi s brojem stanica koje su se podijelile u dvojezgrene i višejezgrene stanice u kontrolnoj kulturi, samo 53 % od tog broja podijelilo u tretiranoj kulturi, tj. postoji citostaza od 47 %.

Kada se ne upotrebljava citohalazin B, preporučuje se ocjenjivanje citotoksičnosti na temelju **relativnog povećanja broja stanica (RICC)** ili na temelju **relativnog udvostručenja populacije (RPD)** (69.) jer se kod obiju vrijednosti uzima u obzir udio populacije stanica u kojima je došlo do diobe.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{povećanje broja stanica u tretiranim kulturama(konačno-početno)})}{(\text{povećanje broja stanica u kontrolnim kulturama(konačno-početno)})} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{br. udvostručenja populacije u tretiranim kulturama})}{(\text{br. udvostručenja populacije u kontrolnim kulturama})} \times 100$$

Pri čemu je:

udvostručenje populacije = [log (broj stanica nakon tretiranja ÷ početni broj stanica)] ÷ log 2

Stoga, RICC ili RPD od 53 % pokazuje citotoksičnost/citostazu od 47 %.

▼**M7**

Primjenom **indeksa proliferacije (PI)** citotoksičnost se može procijeniti brojenjem klonova koji se sastoje od jedne stanice (cl1), dvije stanice (cl2), tri do četiri stanice (cl4) te pet do osam stanica (cl8).

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

Indeks proliferacije upotrebljava se kao koristan i pouzdan parametar citotoksičnosti i za stanične linije uzgojene *in vitro* bez citohalazina B (35., 36., 37., 38.) te može poslužiti kao koristan dodatni parametar.

U svakom slučaju, u tretiranim kulturama i u negativnim kontrolnim kulturama broj stanica prije tretiranja mora biti identičan.

Iako se RCC (tj. broj stanica u tretiranim kulturama / broj stanica u kontrolnim kulturama) u prošlosti upotrebljavao kao parametar citotoksičnosti, više se ne preporučuje jer može podcijeniti citotoksičnost.

Kada se upotrebljavaju automatski sustavi za brojenje, na primjer protočna citometrija, laserska skenirajuća citometrija ili analiza slike, u formuli se broj stanica može zamijeniti brojem jezgri.

U negativnim bi kontrolnim kulturama udvostručenje populacije ili indeks ponavljanja trebali biti u skladu sa zahtjevom da se stanice uzorkuju nakon tretiranja po isteku razdoblja koje otprilike odgovara trajanju 1,5 do 2,0 normalna stanična ciklusa.

▼M3

B.50. **PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA: DA**

UVOD

1. Smjernice OECD-a za ispitivanje kemijskih tvari i ispitne metode EU-a periodički se preispituju u svjetlu znanstvenog napretka, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. Prva ispitna metoda (TM) (B.42) za utvrđivanje preosjetljivosti kože kod miševa, analiza lokalnih limfnih čvorova (LLNA; Smjernica za ispitivanje OECD-a 429) je revidirana (1). Objavljeni su detalji validacije metode LLNA i pregled povezanog djelovanja (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Kod LLNA se za mjerenje proliferacije limfocita uporablja radioizotopni timidin ili jod te je, stoga, uporaba ove analize ograničena ako je nabava, uporaba ili odlaganje radioaktivnosti problematična. LLNA: DA (razvio ju je Daicel Chemical Industries, Ltd) je neradioaktivna inačica LLNA, koja količinski određuje sadržaj adenozin-trifosfata (ATP) pomoću bioluminiscencije kao pokazatelja proliferacije limfocita. Ispitnu metodu LNNA: DA je validirao i pregledao međunarodni odbor za stručnu reviziju koji ju je preporučio kao korisnu za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju preosjetljivost i kemikalija koje ne izazivaju preosjetljivost, uz određena ograničenja (10) (11) (12) (13). Svrha ove ispitne metode je procjena potencijala kemikalija da senzibiliziraju kožu kod životinja (tvari i smjese). Poglavlje B.6. ovog Priloga i Smjernica za ispitivanje OECD-a 406 koriste testove na zamorcima, konkretnije maksimizacijski test sa zamorcima i Buehlerov test (13). Metoda LLNA ima određene prednosti u odnosu na B.6 i Smjernicu za ispitivanje OECD-a 406 (14). Metoda LLNA (poglavlje B.42 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 429) i dvije neradioaktivne inačice, analiza LLNA: DA (poglavlje B.50 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 442 A) i LLNA: BrdU-ELISA (poglavlje B.51 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 442 B), sve imaju prednosti u odnosu na testove na zamorcima iz metode B.6. i Smjernice za ispitivanje OECD-a 406 (14) u smislu manje i usavršene uporabe životinja.

2. Slično kao i metodom LLNA, LLNA: DA proučava indukcijsku fazu senzibilizacije kože i pruža kvantitativne podatke pogodne za procjenjivanje reakcije na dozu. Pored toga, sposobnost otkrivanja senzibilizatora kože bez uporabe radioaktivne oznake za DNA isključuje mogućnost profesionalne izloženosti radioaktivnosti i pitanja odlaganja otpada. To zauzvrat može omogućiti povećanu uporabu miševa za otkrivanje senzibilizatora kože, čime se može dodatno smanjiti uporaba zamoraca za ispitivanje potencijala preosjetljivosti kože (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (14).

DEFINICIJE

3. Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Metoda LLNA: DA je inačica metode LLNA za utvrđivanje kemikalija koje imaju potencijal za uzrokovanje senzibilizacije kože uz posebna ograničenja. To nužno ne znači da u svim slučajevima metodu LLNA: DA treba primijeniti umjesto metode LLNA ili testa sa zamorcima (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (14), već da je pokus jednakovrijedan i da se može koristiti kao alternativa kod koje za pozitivne i negativne rezultate obično nije potrebna daljnja potvrda (10) (11). Ispitni laboratoriji trebaju uzeti u obzir sve dostupne podatke o ispitivanoj tvari prije provođenja studije. Spomenuti podaci uključuju identitet i kemijsku strukturu ispitivane

▼M3

tvari, njezina fizikalno-kemijska svojstva, rezultate svih *in vitro* ili *in vivo* ispitivanja toksičnosti i toksikološke podatke o strukturno povezanim kemikalijama. Ti se podaci uzimaju u obzir radi utvrđivanja prikladnosti metode LLNA: DA za odnosnu tvar (s obzirom na nekompatibilnost određenih vrsta kemikalija s metodom LLNA: DA - vidjeti stavak 5.) i pomoći kod odabira doze.

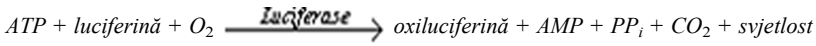
5. Metoda LLNA: DA je metoda *in vivo*, pa kao takva ne isključuje upotrebu životinja u procjeni kontaktne senzibilizacijske aktivnosti. Međutim, ona ima potencijala smanjiti uporabu životinja u tu svrhu u usporedbi s testovima na zamorcima (B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (14). Nadalje, metoda LLNA: DA nudi znatno finiji način upotrebe životinja (manje boli i patnje) u ispitivanju kontaktne senzibilizacije, budući da za razliku od B.6 i Smjernice OECD-a 406 nije potrebno izazivati provokacijski inducirane hipersenzibilizirane dermalne reakcije. Unatoč prednostima metode LLNA: DA u odnosu na B.6 i Smjernicu OECD-a 406, postoje neka ograničenja zbog kojih može biti potrebno primijeniti B.6 ili Smjernicu OECD-a 406 (13) (npr. ispitivanje određenih metala, lažni pozitivni nalazi kod nekih sredstava s nadražujućim djelovanjem na kožu (kao što su neke površinski aktivne tvari) (6) (1. i Poglavlje B.42 iz ovog Priloga), topivost ispitivane tvari). Povrh toga, ispitivanja na zamorcima mogu biti potrebna za kemijske razrede ili tvari koje sadrže funkcionalne skupine za koje je dokazano da djeluju kao potencijalni zbunjujući faktori (16) (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406 (14)). Preporučuje se da se ograničenja koja su utvrđena za metodu LLNA (1. i Poglavlje B.42 iz ovog Priloga) primjenjuju i na metodu LLNA: DA (10). Pored toga, uporaba metode LLNA: DA možda nije primjerena za ispitivanje tvari koje utječu na razine adenozin-trifosfata (ATP) (tj. tvari koje djeluju kao inhibitori ATP-a) ili tvari koje utječu na precizno mjerenje ATP-a u stanicama (npr. prisutnost enzima koji razgrađuju ATP, prisutnost izvanstaničnog ATP-a u limfnom čvoru). Pored takvih utvrđenih ograničenja metoda LLNA: DA se može primjenjivati za ispitivanje bilo koje tvari, osim ako ne postoji mogućnost da bi njezina svojstva mogla utjecati na točnost metode LLNA: DA. Pored toga, potrebno je uzeti u obzir mogućnost graničnih pozitivnih rezultata kada se dobiju vrijednosti stimulacijskog indeksa (SI) između 1,8 i 2,5 (vidjeti stavke 31–32.). To se temelji na bazi podataka za validaciju s 44 tvari s indeksom stimulacije ≥ 1,8 (vidjeti stavak 6.), za koje su metodom LLNA: DA pravilno određena sva 32 senzibilizatora pri LLNA, ali su nepravilno određene tri od 12 tvari koje pri LLNA ne izazivaju preosjetljivost s vrijednostima stimulacijskog indeksa između 1,8 i 2,5 (tj. granično pozitivna vrijednost) (10). Međutim, budući da je za određivanje vrijednosti stimulacijskog indeksa i izračun predvidljivih svojstava ispitivanja uporabljen isti set podataka, navedeni rezultati mogu precijeniti stvarna predvidljiva svojstva.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Metoda LLNA: DA počiva na temeljnom načelu prema kojem senzibilizatori induciraju proliferaciju limfocita u limfnom čvoru čime dolazi do drenaže mjesta kemijske primjene. Ta je proliferacija proporcionalna primijenjenoj dozi i potencijalu primijenjenog alergena te predstavlja jednostavan način za dobivanje kvantitativno izmjerene senzibilizacije. Proliferacija se mjeri usporedbom prosječne proliferacije svake ispitivane skupine s prosječnom proliferacijom u kontrolama tretiranim nosačem. Određuje se omjer prosječne

▼M3

proliferacije u svakoj tretiranoj skupini i proliferacije u kontrolama s nosačem, nazvan indeks stimulacije, koji mora biti ≥ 1,8 da bi se ispitivana tvar mogla dalje vrednovati kao potencijalni senzibilizator kože. Ovdje opisane metode temelje se na mjerenju sadržaja ATP-a bioluminiscencijom (za koju je poznato da je povezana s brojem živućih stanica) (17), kako bi se pokazao povećani broj stanica koje proliferiraju u aurikularnim limfnim čvorovima koji uzrokuju drenažu (18) (19). Metoda bioluminiscencije koristi enzim luciferaze za kataliziranje nastanka svjetlosti iz ATP-a i luciferin u skladu sa sljedećom reakcijom:



Emitirani intenzitet svjetlosti je linearno povezan s koncentracijom ATP-a i mjeri se luminometrom. Analiza reakcije između luciferina i luciferaze je osjetljiva metoda za određivanje ATP-a koji se koristi u širokom opsegu primjena (20).

OPIS ANALIZE

Odabir životinjskih vrsta

7. Za ovaj test odabrana vrsta su miševi. Validacijske studije za LLNA: DA provedene su isključivo sa sojem CBA/J, koji se stoga smatra preporučenim sojem (12) (13). Koriste se mlade odrasle ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu skotne. Na početku studije životinje trebaju biti stare između osam do 12 tjedana, a odstupanje mase životinja treba biti minimalno i ne smije prelaziti 20 % srednje mase. Drugi sojevi i mužjaci mogu se koristiti ako postoji dovoljno podataka da u reakciji prema metodi LLNA: DA nema značajnih razlika specifičnih za soj i/ili spol.

Uvjeti smještaja i prehrane

8. Miševi trebaju biti smješteni u skupinama (21), osim ako se ne dokaže prikladna znanstvena utemeljenost za pojedinačni smještaj. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće.

Priprema životinja

9. Životinje se nasumice biraju, jednoznačno identificiraju (ali ne bilo kojim oblikom označavanja ušiju) i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka doziranja kako bi se aklimatizirale na laboratorijske uvjete. Prije početka tretiranja sve životinje treba pregledati kako bi se potvrdilo da nemaju zapaženih lezija kože.

Priprema ispitnih otopina

10. Tvrde kemikalije se prije primjene na uho miša trebaju rastopiti ili suspendirati u otapalima/nosačima i prema potrebi razrijediti. Tekuće kemikalije se mogu nanijeti čiste ili razrijeđene prije doziranja. Netopive kemikalije, koje se obično koriste u medicinskim uređajima, trebaju se podvrgnuti postupku pretjerane ekstrakcije u odgovarajućem otapalu kako bi se prije primjene na uho miša otkrili svi ekstraktibilni sastojci za ispitivanje. Ispitivane tvari se pripremaju svakodnevno osim ako podaci o stabilnosti ne dokažu prihvatljivost njihova skladištenja.

▼M3

Provjera pouzdanosti

11. Kemikalije pozitivne kontrole koriste se kako bi se dokazalo da se pokus provodi na odgovarajući način tako što reagiraju prikladnom i ponovljivom preosjetljivošću na ispitivanu tvar koja uzrokuje preosjetljivost, čiji je stupanj reakcije točno utvrđen. Preporučuje se uvođenje paralelne pozitivne kontrole radi dokazivanja sposobnosti laboratorija da uspješno izvede svaku analizu i da se omogući ocjenjivanje ponovljivosti i usporedivosti unutar jednog ili između više laboratorija. Određena regulatorna tijela zahtijevaju pozitivnu kontrolu za svaku studiju te se, stoga, korisnici pozivaju da prije izvođenja metode LLNA: DA kontaktiraju relevantna tijela. Sukladno tomu, potiče se rutinska uporaba paralelne pozitivne kontrole kako bi se izbjeglo dodatno ispitivanje na životinjama radi ispunjavanja zahtjeva koji se mogu javiti zbog periodičke uporabe paralelne kontrole (vidjeti stavak 12.). Pozitivna kontrola treba proizvesti pozitivnu reakciju na metodu LLNA: DA kod razine izlaganja za koju se očekuje da će dati porast indeksa stimulacije (SI) $\geq$ 1,8 u odnosu na negativnu kontrolnu skupinu. Dozu pozitivne kontrole treba odabrati tako da ne uzrokuje prekomjernu nadraženost kože ili sustavnu toksičnost i da je indukcija ponovljiva, ali ne prekomjerna (tj. SI > 10 se smatra pretjeranim). Poželjne pozitivne kontrole su 25 %-tni heksilcinamaldehid (CAS br. 101-86-0) i 25 %-tni eugenol (CAS br. 97-53-0) u acetonu: maslinovo ulje (4:1; v/v). Moguće su okolnosti u kojima se, uz odgovarajuće obrazloženje, mogu koristiti druge pozitivne kontrole koje ispunjavaju gore navedene kriterije.

12. Iako se preporučuje uvođenje paralelne skupine pozitivne kontrole, u određenim situacijama periodičko ispitivanje (tj. u intervalima $\leq$ 6 mjeseci) pozitivne kontrole može biti prikladno za laboratorije koji redovito izvode metodu LLNA: DA (tj. najmanje jednom mjesečno) i imaju povijesnu bazu podataka pozitivne kontrole koja dokazuje sposobnost laboratorija da dobiva ponovljive i točne rezultate pozitivnih kontrola. Odgovarajuća osposobljenost za metodu LLNA: DA može se uspješno dokazati dobivanjem dosljednih pozitivnih rezultata pozitivne kontrole u najmanje deset neovisnih ispitivanja provedenih u razumnom vremenskom razdoblju (manje od jedne godine).

13. Paralelnu skupinu pozitivne kontrole potrebno je uvesti svaki put kada dođe do proceduralne promjene metode LLNA: DA (zamjena stručnog osoblja, promjena materijala i/ili reagensa ispitne metode, promjena opreme, promjena izvora ispitivanih životinja) i te se promjene moraju navesti u laboratorijskim izvješćima. Potrebno je uzeti u obzir učinak tih promjena na primjerenost prethodno uspostavljene baze podataka prilikom utvrđivanja potrebe za uspostavom nove baze povijesnih podataka radi dokazivanja dosljednosti rezultata pozitivne kontrole.

14. Istraživači trebaju biti svjesni da odluka o provođenju periodičke umjesto paralelne studije pozitivne kontrole utječe na prikladnost i prihvatljivost negativnih rezultata dobivenih bez paralelne pozitivne kontrole u razdoblju između svake periodičke pozitivne kontrole. Na primjer, ako se periodičkom pozitivnom kontrolom dobije lažni negativni rezultat, mogu se dovesti u pitanje negativni rezultati ispitivane tvari dobiveni u razdoblju između posljednje prihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije i neprihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije. Kod odlučivanja o uvođenju paralelne pozitivne kontrole ili provođenju samo periodičkih pozitivnih kontrola potrebno je pažljivo uzeti u obzir posljedice tih rezultata. Također je potrebno razmotriti mogućnost uporabe manjeg broja životinja u skupini paralelne pozitivne kontrole ako je to opravdano sa znanstvenog stajališta i ako laboratorij na temelju svojih posebnih povijesnih podataka dokaže da se može koristiti manje miševa (22).

▼M3

15. Iako pozitivnu kontrolnu tvar treba ispitati u nosaču za koji je poznato da izaziva dosljednu reakciju (npr. aceton; maslinovo ulje; 4:1, v/v), u nekim regulatornim situacijama bit će potrebno i ispitivanje u nestandardnom nosaču (klinički/kemijski relevantnoj formulaciji) (23). Ako se paralelna pozitivna kontrola ispituje u drugačijem nosaču od ispitivane tvari, potrebno je uključiti posebnu kontrolu s nosačem za paralelnu pozitivnu kontrolu.

16. U slučajevima kada se ocjenjuju tvari iz posebnog kemijskog razreda ili raspona reakcija, referentne tvari mogu također biti korisne za dokazivanje ispravnosti ispitne metode za otkrivanje potencijala preosjetljivosti kože tih vrsta ispitivanih tvari. Prikladne referentne tvari moraju imati sljedeće značajke:

— strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom ispitivane tvari,

— poznata fizikalna/kemijska svojstva,

— popratne podatke iz LLNA: DA,

— popratne podatke od drugih životinjskih modela i/ili ljudi.

ISPITNI POSTUPAK

Broj životinja i visine doze

17. Po jednoj dozirnoj skupini koriste se najmanje četiri životinje, s najmanje tri koncentracije ispitivane tvari, plus paralelna negativna kontrolna skupina tretirana samo nosačem za ispitivanu tvar i jedna pozitivna kontrola (paralelna ili nedavno provedena, na temelju laboratorijske politike uzimajući u obzir stavke 11.-15.). Potrebno je razmotriti ispitivanje višestrukih doza pozitivne kontrole, posebno ako se ispitivanje pozitivne kontrole izvodi s prekidima. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati i tretirati ih jednako kao i životinje u tretiranim skupinama.

18. Odabir doze i nosača treba se temeljiti na preporukama navedenim u referencama (2) i (24). Uzastopne doze se obično odabiru iz odgovarajućih serija koncentracija kao što su 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Odabir uporabljene serije koncentracija mora biti popraćen odgovarajućim znanstvenim obrazloženjem. Kod odabira tri uzastopne koncentracije treba uzeti u obzir sve postojeće toksikološke podatke (o akutnoj toksičnosti i nadraživanju kože) te strukturne i fizikalno-kemijske podatke o odnosnoj ispitivanoj tvari (i/ili strukturno povezanim tvarima), ako su dostupne, kako bi se najvišom koncentracijom maksimaliziralo izlaganje, ali istodobno izbjegla sustavna toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (24)(25). U nedostatku tih podataka može biti potrebno provesti početno predprobiranje (vidjeti stavke 21.-24.).

19. Nosač ne smije ometati niti utjecati na rezultate ispitivanja i treba se odabrati na temelju povećanja topljivosti s ciljem postizanja što viših koncentracija, a da se istodobno proizvede otopina/suspenzija pogodna za primjenu ispitivane tvari. Kao nosači preporučuju se aceton: maslinovo ulje (4:1 v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol i dimetil sulfoksid (6), ali mogu se koristiti i drugi ako se to dostatno znanstveno obrazloži. U nekim situacijama može biti potrebno primijeniti klinički relevantno otapalo ili komercijalnu formulaciju u kojoj se ispitivana tvar prodaje, kao dodatnu kontrolu. Posebno treba paziti da u sustav nosača budu ugrađene hidrofilne ispitivane tvari koje vlaže kožu i ne isušuju se odmah, uključivanjem odgovarajućih sredstava za otapanje (npr. 1 %-tnim Pluronic® L92). Znači, nosače koji su u potpunosti vodeni treba izbjegavati.

▼M3

20. Obrada limfnih čvorova pojedinačnih miševa omogućuje ocjenjivanje promjenljivosti među životinjama i statističku usporedbu razlika između mjerenja ispitivanom tvari i kontrolnom skupinom s nosačem (vidjeti stavak 33.). Pored toga, ocjenjivanje mogućnosti smanjenja broja miševa u skupini pozitivne kontrole je izvedivo nakon što se prikupe pojedinačni podaci o životinjama (22). Određena regulatorna tijela nadalje zahtijevaju da se prikupe pojedinačni podaci o životinjama. Redovito prikupljanje pojedinačnih podataka o životinjama osigurava prednosti za dobrobit životinja, tako što se izbjegava dvostruko ispitivanje koje bi bilo potrebno, ako bi regulatorna tijela kasnije razmatrala rezultate izvorno prikupljene na jedan način (npr. preko grupnih podataka o životinjama), zajedno s drugim zahtjevima (npr. pojedinačni podaci o životinjama).

Predprobiranje

21. Ako nisu dostupne informacije za određivanje najviše doze za ispitivanje (vidjeti stavak 18.) potrebno je obaviti predprobiranje kako bi se odredila odgovarajuća visina doze za ispitivanje u LLNA: DA. Svrha predprobiranja je pružiti smjernice za odabir najviše doze za uporabu u glavnoj studiji LLNA: DA, ako nisu dostupne informacije o koncentraciji koja uzrokuje sustavnu toksičnost (vidjeti stavak 24.) i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (vidjeti stavak 23.). Najveća ispitana visina doze je 100 %-tna ispitivana tvar za tekućine ili najveća moguća koncentracija za krute tvari ili suspenzije.

22. Predprobiranje se izvodi u uvjetima koji su identični glavnoj studiji LLNA: DA, s razlikom da se ne ocjenjuje proliferacija limfnih čvorova i može se koristiti manje životinja po dozirnoj skupini. Preporučuje se uporaba jedne ili dvije životinja po dozirnoj skupini. Svi miševi se svakodnevno prate s ciljem otkrivanja kliničkih znakova sustavne toksičnosti ili lokalnog nadraživanja na mjestu primjene. Tjelesna masa se bilježi prije ispitivanja i prije završetka (8. dan). Oba uha svakog miša se pregledavaju radi otkrivanja eritema i boduju prema tablici 1. (25). Debljina uha se mjeri posebnim mjernim instrumentom (pr. digitalnim mikrometrom ili mjeračem debljine Peacock Dial) prvi dan (prije doze), treći dan (otprilike 48 sati nakon prve doze), sedmi dan (24 sata prije završetka) i osmi dan. Pored toga, osmi dan se debljina uha može odrediti mjerenjem mase uzorka uha dobivenog probijanjem, što se izvodi nakon humanog usmrćenja. Prekomjerno lokalno nadraživanje kože se označuje bodovima za eriteme ≥ 3 i/ili povećanjem debljine uha za ≥ 25 % na bilo koji dan mjerenja (26) (27). Najviša odabrana doza za glavnu studiju LLNA: DA je sljedeća niža doza iz serije koncentracija u predprobiranju (vidjeti stavak 18.) koja ne uzrokuje sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože.

Tablica 1.

Bodovanje eritema

Zapažanja	Bodovi
Bez eritema	0
Vrlo slabi eritem (jedva zamjetan)	1
Dobro vidljiv eritem	2

▼M3

Zapažanja	Bodovi
Umjeren do jak eritem	3
Jak eritem (crvenilo cikle) do nekroze kože što onemogućuje stupnjevanje eritema	4

23. Pored 25 %-tnog povećanja debljine uha (26)(27), statistički značajno povećanje debljine uha kod tretiranih miševa u odnosu na kontrolne miševe se, također, koristi za određivanje nadražujućih tvari u LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Međutim, iako se statistički značajna povećanja debljine uha mogu javiti, ona se posebno ne povezuju s prekomjernim nadraživanjem kada su manja od 25 % (30) (32) (33) (34).

24. Sljedeća klinička opažanja mogu ukazivati na sustavnu toksičnost (35) kada se koriste u okviru cjelokupne ocjene te, stoga, mogu naznačiti najvišu dozu za uporabu u glavnoj LLNA: DA: promjene u djelovanju živčanog sustava (npr. piloerekcija, ataksija, tremori i grčevi); promjene u ponašanju (npr. agresivnost, promjene u njezi, značajna promjena u stupnju aktivnosti); promjene u disanju (npr. promjene učestalosti i intenziteta disanja kao što su dispneja, zadihanost i hroptanje) i promjene u konzumaciji hrane i vode. Prilikom ocjenjivanja treba uzeti u obzir znakove letargije i/ili nereagiranja, sve kliničke znakove boli i patnje koji nisu blagi ili trenutačni, ili gubitak težine > 5 % od prvog do osmog dana i smrtnost. Životinje koje su pred uginućem ili pokazuju znakove teške boli i patnje trebaju se humano usmrtiti (36).

Plan pokusa glavne studije

25. Plan pokusa je sljedeći:

— *Prvi dan:* Pojedinačno identificirati životinje i zabilježiti masu svake životinje i sva klinička opažanja. Primijeniti 1 %-tnu vodenu otopinu natrijevog laurel sulfata (SLS) na stražnju stranu svakog uha koristeći četkicu umočenu u otopinu SLS za premaz stražnje strane svakog uha u četiri do pet poteza. Sat vremena nakon tretiranja SLS-om primijeniti 25 µl odgovarajuće otopine ispitivane tvari, samog nosača ili pozitivne kontrole (paralelna ili nedavno provedena, ovisno o laboratorijskoj politici uzimajući u obzir stavke 11.-15.) na stražnji dio svakog uha.

— *Drugi, treći i sedmi dan:* Ponoviti predtretman 1 %-tnom vodenom otopinomu SLS-a i postupak primjene proveden prvog dana.

— *Četvrti, peti i šesti dan:* Bez tretiranja.

— *Osmi dan:* Zabilježiti masu svake životinje i sva klinička opažanja. Otprilike 24 do 30 sati nakon početka primjene sedmog dana životinje humano usmrtiti. Izrezati drenažne aurikularne limfne čvorove iz svakog uha i staviti odvojeno u pufer PBS za svaku životinju. Pojedinosti i sheme za identifikaciju i disekciju limfnih čvorova mogu se naći u referenci (22). Za daljnje praćenje lokalne reakcije kože u glavnoj studiji mogu se u protokol studije uključiti dodatni parametri kao što su ocjenjivanje eritema ušiju ili mjerenja debljine uha (dobiveni uređajem za mjerenje debljine ili određivanjem mase uzorka uha pri obdukciji).

▼M3

Priprema suspenzije stanica

26. Suspenzija pojedinačnih stanica limfnih čvorova (LNC) svakog miša, odstranjenih bilateralno, priprema se tako da se limfni čvorovi stave između dva predmetna stakalca koja se lagano pritisnu kako bi se zdrobili čvorovi. Nakon provjere da se tkivo raširilo u tanki sloj, stakalca se odvajaju. Tkivo na oba stakalca se suspendira u PBS-u tako da se svako stakalce drži pod kutom nad Petrijevom zdjelicom i ispere PBS-om istodobno strugajući tkivo sa stakalca odgovarajućim priborom. Limfni čvorovi životinja u negativnoj kontroli su mali te je stoga važno njima pažljivo rukovati da ne dođe do umjetnog učinka na vrijednosti SI. Za ispiranje oba stakalca koristi se ukupno 1 ml PBS. Suspenzija iz stanica limfnih čvorova u Petrijevoj zdjelici se lagano homogenizira strugalom za stanice. Potom se mikropipetom prikupi 20 µL alikvota suspenzije LNC-a pazeći da se ne pobere membrana koja je vidljiva okom, i naknadno se pomiješa s 1,98 ml PBS kako bi se dobilo 2 ml uzorka. Istim postupkom se pripremi drugi uzorak od 2 ml, tako da za svaku životinju budu pripravljena dva uzorka.

Određivanje proliferacije stanica (mjerenje sadržaja ATP-a u limfocitima)

27. Povećanje sadržaja ATP-a u limfnim čvorovima mjeri se metodom luciferin/luciferaza koristeći komplet za mjerenje ATP-a, koji mjeri bioluminiscenciju u relativnim luminiscentnim jedinicama (RLU). Trajanje analize od trenutka usmrćenja životinja do mjerenja sadržaja ATP-a za svaku pojedinačnu životinju mora biti jednako, otprilike 30 minuta, budući da se smatra da sadržaj ATP-a postupno opada po usmrćenju životinja (12). Stoga se serija postupaka od izrezivanja aurikularnih limfnih čvorova do mjerenja ATP-a mora dovršiti u 20 minuta prema unaprijed određenom rasporedu koji je jednak za svaku životinju. Luminiscencija ATP-a se mjeri u svakom uzorku od 2 ml tako da se za svaku životinju prikupe dva mjerenja ATP-a. Potom se određuje prosječna luminiscencija ATP-a koja se koristi u daljnjim izračunima (vidjeti stavak 30.).

OPAŽANJA

Klinička opažanja

28. Sve miševe treba pomno opažati najmanje jednom dnevno s obzirom na sve kliničke znakove lokalnog nadraživanja na mjestu primjene ili sustavne toksičnosti. Sva opažanja sustavno se bilježe za svaku životinju. Programi praćenja uključuju kriterije za pravodobno identificiranje miševa koji pokazuju znakove sustavne toksičnosti, prekomjernog lokalnog nadraživanja kože ili korozije kože za eutanaziju (36).

Tjelesne mase

29. Kao što je navedeno u stavku 25., pojedinačne tjelesne mase treba mjeriti na početku testa i u vrijeme planiranog usmrćivanja životinja.

IZRAČUN REZULTATA

30. Rezultati za svaku tretiranu skupinu su izraženi kao prosječni indeks stimulacije (SI). SI se dobiva dijeljenjem prosječne RLU po životinji unutar svake skupine tretirane ispitivanom tvari i pozitivne kontrolne skupine s prosječnim RLU po životinji za kontrolnu skupinu otopine/nosača. Prosječan SI za kontrolne skupine tretirane nosačem tada iznosi 1.

▼M3

31. U postupku odlučivanja rezultat se smatra pozitivnim kada je SI ≥ 1,8 (10). Međutim, kod odlučivanja da se neki granični rezultat (tj. vrijednost SI između 1,8 i 2,5) proglasi pozitivnim može se, također, koristiti snaga učinka na dozu, statistički značaj i dosljednost reakcija u otapalu/nosaču i pozitivnoj kontroli (2) (3) (37).

32. U slučaju graničnog pozitivnog rezultata s vrijednošću SI između 1,8 i 2,5, za potvrđivanje pozitivnog rezultata korisnici mogu, pored vrijednosti SI, uzeti u obzir i dodatne podatke kao što je odnos između doze i reakcije, dokaz sustavne toksičnosti ili prekomjerne nadraženosti i, prema potrebi, statistički značaj (10). Također je potrebno uzeti u obzir razna svojstva ispitivane tvari, uključujući i to ima li strukturne veze s poznatim senzibilizatorima kože, uzrokuje li pretjerano nadraživanje kože kod miševa i prirodu odnosa reakcije na dozu koja je opažena. Ova i druga pitanja detaljno su razmotrena drugdje (4).

33. Prikupljanje podataka na razini pojedinačnog miša omogućit će statističku analizu prisutnosti i stupnja odnosa između doze i učinka. Svaka statistička procjena može uključiti ocjenu odnosa između doze i učinka te odgovarajući prilagođene usporedbe ispitnih skupina (npr. skupina s doziranjem u parovima u odnosu na paralelne kontrolne skupine s otapalom/nosačem). Statističke analize mogu uključiti linearnu regresiju ili Williamsov test za ocjenu trendova odnosa doza-učinak i Dunnettov test za usporedbe u parovima. Prilikom odabira prikladne metode statističke analize istraživač treba biti svjestan eventualnih razlika između varijanata kao i drugih problema s tim u vezi, zbog kojih može biti neophodna transformacija podataka ili neparametarska statistička analiza. U svakom slučaju istraživač će možda morati izvršiti izračune SI i statističke analize sa sigurnim točkama podataka (koji se ponekad nazivaju „netipične vrijednosti”) i bez njih.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

34. Podatke treba sažeti u tabličnom obliku koji pokazuje vrijednosti relativne luminiscentne jedinice za pojedinačnu životinju, prosječnu relativnu luminiscentnu jedinicu po životinji za skupinu, s tim povezane pogreške (npr. SD, SEM) i prosječni SI za svaku dozirnu skupinu u odnosu na paralelnu kontrolnu skupinu s otapalom/nosačem.

Izvješće o ispitivanju

35. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane i kontrolne tvari:

— identifikacijski podaci (npr. brojevi CAS i EZ, ako poznati, podrijetlo, čistoća, poznate nečistoće, broj šarže),

— fizikalna priroda i fizikalno-kemijska svojstva (npr. hlapljivost, stabilnost, topljivost),

— ako je mješavina, sastav i relativni postoci sastojaka.

Otapalo/nosač:

— identifikacijski podaci (čistoća, koncentracija (prema potrebi); upotrijebljeni volumen),

— dokaz opravdanosti izbora nosača.

▼M3

Ispitne životinje:

— podrijetlo miševa CBA,

— mikrobiološki status životinja, ako je poznat,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Uvjeti ispitivanja:

— podrijetlo, broj šarže i podaci proizvođača o osiguranju kakvoće/kontroli kakvoće za komplet ATP,

— pojedinosti o pripravljanju i primjeni ispitivane tvari,

— dokaz opravdanosti odabira doze (uključujući rezultate predprobiranja, ako je provedeno),

— koncentracije nosača i ispitivane tvari koji su upotrijebljeni i ukupna količina ispitivane tvari koja je primijenjena,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući vrstu/podrijetlo hrane, izvor vode),

— pojedinosti o programima tretiranja i uzorkovanja,

— metode mjerenja toksičnosti,

— kriteriji za određivanje studija pozitivnima ili negativnima,

— pojedinosti o bilo kojim odstupanjima od protokola i objašnjenje učinaka tog odstupanja na izradu i rezultate studije,

Provjera pouzdanosti:

— sažetak rezultata najsvježije provjere pouzdanosti uključujući informacije o upotrijebljenoj ispitanoj tvari, koncentraciji i nosaču,

— podaci o paralelnim i/ili povijesnim pozitivnim kontrolama i paralelnim negativnim kontrolama (s otapalom/nosačem) za ispitni laboratorij,

— ako nije uključena paralelna pozitivna kontrola, datum i laboratorijsko izvješće za posljednju periodičku pozitivnu kontrolu i izvješće u kojem se navode povijesni pozitivni kontrolni podaci za laboratorij, kojima se opravdava neprovođenje paralelne pozitivne kontrole,

Rezultati:

— pojedinačne mase miševa na početku doziranja i u vrijeme planiranog usmrćenja, srednja i povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za svaku tretiranu skupinu,

— vrijeme prve pojave i znakova toksičnosti, uključujući eventualno nadraživanje kože na mjestu primjene, za svaku životinju,

— vrijeme usmrćenja životinje i mjerenja ATP-a za svaku životinju,

— tablica vrijednosti RLU za pojedinačne miševe i vrijednosti SI za svaku dozirnu tretiranu skupinu,

— srednja i povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za RLU/miš za svaku tretiranu skupinu i rezultati analize netipičnih vrijednosti za svaku tretiranu skupinu,

▼M3

— izračunani SI i prikladno mjerilo promjenljivosti koje uzima u obzir promjenljivost između životinja u ispitivanoj tvari i kontrolnim skupinama,

— odnos doza – reakcija,

— statistička analiza, ako je primjereno,

Rasprava o rezultatima:

— kratki komentar o rezultatima, analiza doza-reakcije, i prema potrebi, statističke analize, sa zaključkom o tome treba li ispitivanu tvar smatrati senzibilizatorom kože.

REFERENCE

1. OECD (2010.), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996.), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, str. 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996.), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, str. 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998.), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, str. 327-333.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000.), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, str. 49-59.

6. ICCVAM (1999.), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, str. 258-273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, str. 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, str. 249-257.

10. ICCVAM (2010.), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

11. ICCVAM (2009.), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008.), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, str. 1-10.

13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008.), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, str. 11-26.

14. OECD (1992.), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

15. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008.), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, str. 1896-1904.

16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009.), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, str. 90-96.

17. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993.), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984.), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, str. 127-132.

19. Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003.), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, str. 27-34.

20. Lundin A. (2000.), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, str. 346-370.

21. ILAR (1996.), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

22. ICCVAM (2009.), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

23. McGarry, H.F. (2007.), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, str. 71-89.

24. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994.), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, str. 13-31.

25. OECD (2002.), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007.), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, str. 235.

27. ICCVAM (2009.), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998.), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, str. 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998.), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, str. 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998.), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, str. 245-256.

31. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999.), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, str. 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005.), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, str. 60-68.

33. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005.), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, str. 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007.), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, str. 1023-1028.

35. ICCVAM (2009.), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

36. OECD (2000.), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998.), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 str. 563-79.

38. OECD (2005.), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Ovaj se termin često koristi umjesto „podudarnosti” kako bi se označio udio točnih rezultata ispitne metode (38).

Referentna tvar: tvar koja uzrokuje ili ne uzrokuje preosjetljivost i koja se koristi kao standard za usporedbu s ispitivanom tvari. Referentna tvar treba imati sljedeće svojstva: i. dosljedni i pouzdani izvor(i); ii. strukturna i funkcionalna sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznate fizikalno-kemijske značajke; iv. popratni podaci o poznatim učincima; i v. poznata učinkovitost u okviru željene reakcije.

Lažno negativna tvar: tvar koja je ispitnom metodom netočno određena kao negativna ili neaktivna kada je u stvari pozitivna ili aktivna.

Lažno pozitivna tvar: tvar koja je ispitivanjem netočno određena kao pozitivna ili aktivna kada je u stvari negativna ili neaktivna.

Opasnost: potencijal štetnog učinka na zdravlje ili okoliš. Štetni učinak se javlja samo ako je stupanj izloženosti dovoljno visok.

Ponovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji koji koriste isti protokol i ispituju istu tvar, mogu proizvesti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate. Ponovljivost između laboratorija se određuje prije i tijekom validacijskog postupka i pokazuje u kojoj se mjeri neko ispitivanje može uspješno prenijeti iz jednog laboratorija u drugi, također navedena kao međulaboratorijska ponovljivost (38).

Ponovljivost u laboratoriju: određivanje u kojoj mjeri stručno osoblje u okviru istog laboratorija može uspješno ponoviti rezultate koristeći određeni protokol u različitim trenucima. Također se navodi kao unutarlaboratorijska ponovljivost (38).

Netipična vrijednost: netipična vrijednost je zapažanje koje značajno odstupa od ostalih vrijednosti u nasumičnom uzorku populacije.

Osiguranje kvalitete: postupak upravljanja pri kojem pojedinci neovisni od osoba koje provode ispitivanje, ocjenjuju ispunjavanje standarda laboratorijskog ispitivanja, zahtjeve i postupke vođenja evidencije te točnost prijenosa podataka.

Pouzdanost: mjera u kojoj se ispitna metoda može ponoviti unutar i između laboratorija tijekom vremena uporabom istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem unutarlaboratorijske i međulaboratorijske ponovljivosti (38).

Preosjetljivost kože: imunološki proces koji se javlja kada je osjetljivi pojedinac lokalno izložen kemijskom alergenu koji uzrokuje imunosnu reakciju kože koja može dovesti do kontaktne preosjetljivosti.

Indeks stimulacije (SI): izračunana vrijednost za ocjenjivanje potencijala preosjetljivosti kože koju može uzrokovati ispitivana tvar, koja je omjer proliferacije u tretiranim skupinama i paralelnoj kontrolnoj skupini s nosačem.

Ispitivana tvar (navodi se također kao i ispitivana kemikalija): svaka tvar ili smjesa koja je ispitana ovom metodom.

▼M3

B.51. **PREOSJETLJIVOST KOŽE: ANALIZA LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA: BrdU-ELISA**

UVOD

1. Smjernice OECD-a za ispitivanje kemijskih tvari i ispitnih metoda EU-a se periodički preispituju u svjetlu znanstvenog napretka, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. Prva ispitna metoda (TM) (B.42) za utvrđivanje preosjetljivosti kože kod miševa, analiza lokalnih limfnih čvorova (LLNA; Smjernica za ispitivanje OECD-a 429) je revidirana (1. i poglavlje B.42. u ovome Prilogu). Objavljeni su detalji validacije metode LLNA i pregled povezanog djelovanja (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Kod LLNA se za mjerenje proliferacije limfocita uporablja radioizotopni timidin ili jod te je stoga uporaba ove analize ograničena ako je nabava, uporaba ili odlaganje radioaktivnosti problematična. LLNA: BrdU-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je neradioaktivna inačica metode LLNA, u kojoj se koristi radioaktivno neoznačeni 5-bromo 2-deoksiuridin (BrdU) (CAS br. 59-14-3) u sustavu ispitivanja koji se temelji na ELISA za mjerenje proliferacije limfocita. Ispitnu metodu LNNA: BrdU-ELISA je validirao i pregledao međunarodni nezavisni odbor za stručnu reviziju koji ju je preporučio kao korisnu za utvrđivanje kemikalija koje izazivaju preosjetljivost i kemikalija koje ne izazivaju preosjetljivost, uz određena ograničenja (10) (11) (12). Svrha ove ispitne metode je procjena potencijala kemikalija da senzibiliziraju kožu kod životinja (tvari i smjese). Poglavlje B.6. ovog Priloga i Smjernica za ispitivanje OECD-a 406 koriste testove na zamorcima, konkretnije maksimizacijski test sa zamorcima i Buehlerov test (13). Metoda LLNA (poglavlje B.42 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 429) i dvije neradioaktivne inačice, analiza LLNA: BrdU-ELISA (poglavlje B.51 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 442 B) i LLNA: DA (poglavlje B.50 ovog Priloga; Smjernica za ispitivanje OECD-a 442 A), sve imaju prednosti u odnosu na testove na zamorcima iz metode B.6. i Smjernica za ispitivanje OECD-a 406 (13) u smislu manje i usavršene uporabe životinja.

2. Slično kao i metodom LLNA, LLNA: BrdU-ELISA proučava indukcijsku fazu senzibilizacije kože i pruža kvantitativne podatke pogodne za procjenjivanje reakcije na dozu. Pored toga, sposobnost otkrivanja senzibilizatora kože bez uporabe radioaktivne oznake za DNA isključuje mogućnost profesionalne izloženosti radioaktivnosti i pitanja odlaganja otpada. To zauzvrat može omogućiti povećanu uporabu miševa za otkrivanje senzibilizatora kože, čime se može dodatno smanjiti uporaba zamoraca za ispitivanje potencijala preosjetljivosti kože (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13).

DEFINICIJE

3. Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Metoda LLNA: BrdU-ELISA je inačica metode LLNA za utvrđivanje kemikalija koje imaju potencijal za uzrokovanje senzibilizacije kože uz posebna ograničenja. To nužno ne znači da u svim slučajevima metodu LLNA: BrdU-ELISA treba primijeniti umjesto metode LLNA ili testa sa zamorcima (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13), već da je pokus jednakovrijedan i da se može koristiti kao alternativa kod koje za pozitivne i negativne rezultate obično nije potrebna daljnja potvrda (10) (11). Ispitni laboratoriji trebaju uzeti u obzir sve dostupne podatke o ispitivanoj tvari prije provođenja studije. Spomenuti podaci uključuju identitet i kemijsku strukturu ispitivane tvari, njezina fizikalno-kemijska svojstva, rezultate svih

▼M3

in vitro ili *in vivo* ispitivanja toksičnosti i toksikološke podatke o strukturno povezanim kemikalijama. Ti se podaci uzimaju u obzir radi utvrđivanja prikladnosti metode LLNA: BrdU-ELISA za odnosnu tvar (s obzirom na nekompatibilnost određenih vrsta kemikalija s metodom LLNA: BrdU-ELISA - vidjeti stavak 5.) i pomoći kod odabira doze.

5. Metoda LLNA: BrdU-ELISA je metoda *in vivo*, pa kao takva ne isključuje uporabu životinja u procjeni kontaktne senzibilizacijske aktivnosti. Ona, međutim, ima potencijala smanjiti uporabu životinja u tu svrhu u usporedbi s testovima na zamorcima (B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406) (13). Nadalje, metoda LLNA: BrdU-ELISA nudi znatno finiji način uporabe životinja u ispitivanju kontaktne senzibilizacije, budući da za razliku od B.6 i Smjernice OECD-a 406 nije potrebno izazivati provokacijski inducirane hipersenzibilizirane dermalne reakcije. Nadalje, za metodu LLNA: BrdU-ELISA nije potrebno koristiti adjuvans, kao što je to slučaj s maksimizacijskim testom sa zamorcima (poglavlje B.6 ovog Priloga, 13). Metoda LLNA: BrdU-ELISA smanjuje patnju životinja. Unatoč prednostima metode LLNA: BrdU-ELISA u odnosu na B.6 i Smjernicu OECD-a 406 (13), postoje neka ograničenja zbog kojih može biti potrebno primijeniti B.6 ili Smjernicu OECD-a 406 (npr. ispitivanje određenih metala, lažni pozitivni nalazi kod nekih sredstava s nadražujućim djelovanjem na kožu (kao što su neke površinski aktivne tvari) (6) (1. i poglavlje B.42 iz ovog Priloga), topivost ispitivane tvari). Povrh toga, ispitivanja na zamorcima mogu biti potrebna za kemijske razrede ili tvari koje sadrže funkcionalne skupine za koje je dokazano da djeluju kao potencijalni zbunjujući faktori (15) (tj. B.6; Smjernica za ispitivanje OECD-a 406 (13). Preporučuje se da se ograničenja koja su utvrđena za metodu LLNA) (1. i poglavlje B.42 iz ovog Priloga) primjenjuju i na metodu LLNA: BrdU-ELISA (10). Pored takvih utvrđenih ograničenja metoda LLNA: BrdU-ELISA se može primjenjivati za ispitivanje bilo koje kemikalije, osim ako ne postoji mogućnost da bi njezina svojstva mogla utjecati na točnost metode LLNA: BrdU-ELISA. Pored toga, potrebno je uzeti u obzir mogućnost graničnih pozitivnih rezultata kada se dobiju vrijednosti stimulacijskog indeksa (SI) između 1,6 i 1,9 (vidjeti stavke 31–32.). To se temelji na bazi podataka za validaciju s 43 tvari s indeksom stimulacije ≥ 1,6 (vidjeti stavak 6.), za koje su metodom LLNA: BrdU-ELISA pravilno određena sva 32 senzibilizatora pri LLNA, ali su nepravilno određene dvije od 11 tvari koje pri LLNA ne izazivaju preosjetljivost s vrijednostima stimulacijskog indeksa između 1,6 i 1,9 (tj. granično pozitivna vrijednost) (10). Međutim, budući da je za određivanje vrijednosti stimulacijskog indeksa i izračun predvidljivih svojstava ispitivanja uporabljen isti set podataka, navedeni rezultati mogu precijeniti stvarna predvidljiva svojstva.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Metoda LLNA: BrdU-ELISA počiva na temeljnom načelu prema kojem senzibilizatori induciraju proliferaciju limfocita u limfnom čvoru čime dolazi do drenaže mjesta kemijske primjene. Ta je proliferacija proporcionalna primijenjenoj dozi i potencijalu primijenjenog alergena te predstavlja jednostavan način za dobivanje kvantitativno izmjerene senzibilizacije. Proliferacija se mjeri usporedbom prosječne proliferacije svake ispitivane skupine s prosječnom proliferacijom u kontrolnoj skupini tretiranoj nosačem. Određuje se omjer prosječne proliferacije u svakoj tretiranoj skupini i proliferacije u paralelnoj kontrolnoj skupini s nosačem, nazvan indeks stimulacije, koji mora biti ≥ 1,6 da bi se ispitivana tvar mogla dalje

▼M3

vrednovati kao potencijalni senzibilizator kože. Ovdje opisane metode temelje se na mjerenju sadržaja BrdU kako bi se pokazao povećani broj stanica koje proliferiraju u aurikularnin limfnim čvorovima koji uzrokuju drenažu. BrdU je analogan timidinu i slično se uključuje u proliferirajuće stanice DNA. Uključivanje BrdU se mjeri testom ELISA koji koristi specifično protutijelo za BrdU, koje je također označeno peroksidazom. Ako se doda supstrat, peroksidaza reagira sa supstratom i nastane obojani produkt koji se količinski određuje pri određenoj apsorbanci koristeći čitač mikrotitarskih pločica.

OPIS ANALIZE

Odabir životinjskih vrsta

7. Za ovaj test odabrana vrsta su miševi. Validacijske studije za LLNA: BrdU-ELISA provedene su isključivo sa sojem CBA/JN, koji se stoga smatra preporučenim sojem (10) (12). Koriste se mlade odrasle ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu skotne. Na početku studije životinje trebaju biti stare između osam do 12 tjedana, a odstupanje mase životinja treba biti minimalno i ne smije prelaziti 20 % srednje mase. Drugi sojevi i mužjaci mogu se koristiti ako postoji dovoljno podataka da u reakciji prema metodi LLNA: BrdU-ELISA nema značajnih razlika specifičnih za soj i/ili spol.

Uvjeti smještaja i prehrane

8. Miševi trebaju biti smješteni u skupinama (16), osim ako se ne dokaže prikladna znanstvena utemeljenost za pojedinačni smještaj. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost treba biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može koristiti konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće.

Priprema životinja

9. Životinje se nasumice biraju, jednoznačno identificiraju (ali ne bilo kojim oblikom označavanja ušiju) i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka doziranja kako bi se aklimatizirale na laboratorijske uvjete. Prije početka tretiranja sve životinje treba pregledati kako bi se potvrdilo da nemaju zapaženih lezija kože.

Priprema ispitnih otopina

10. Tvrde kemikalije se prije primjene na uho miša trebaju rastopiti ili suspendirati u otapalima/nosačima i prema potrebi razrijediti. Tekuće kemikalije se mogu nanijeti čiste ili razrijeđene prije doziranja. Netopive kemikalije, koje se obično koriste u medicinskim uređajima, trebaju se podvrgnuti postupku pretjerane ekstrakcije u odgovarajućem otapalu kako bi se prije primjene na uho miša otkrili svi ekstraktibilni sastojci za ispitivanje. Ispitivane tvari se pripremaju svakodnevno osim ako podaci o stabilnosti ne dokažu prihvatljivost njihova skladištenja.

Provjera pouzdanosti

11. Kemikalije pozitivne kontrole koriste se kako bi se dokazalo da se pokus provodi na odgovarajući način tako što reagiraju prikladnom i ponovljivom preosjetljivošću kao ispitivana tvar koja uzrokuje preosjetljivost, čiji je stupanj reakcije točno utvrđen. Preporučuje se uvođenje paralelne pozitivne kontrole radi dokazivanja sposobnosti laboratorija da uspješno izvede svaku analizu i da se omogući ocjenjivanje ponovljivosti i usporedivosti unutar jednog ili između više laboratorija. Određena regulatorna tijela zahtijevaju pozitivnu kontrolu za svaku studiju te se, stoga, korisnici pozivaju da prije

▼M3

izvođenja metode LLNA: BrdU-ELISA kontaktiraju relevantna tijela. Sukladno tomu, potiče se rutinska uporaba paralelne pozitivne kontrole kako bi se izbjeglo dodatno ispitivanje na životinjama radi ispunjavanja zahtjeva koji se mogu javiti zbog periodičke uporabe paralelne kontrole (vidjeti stavak 12.). Pozitivna kontrola treba proizvesti pozitivnu reakciju na metodu LLNA: BrdU-ELISA kod razine izlaganja za koju se očekuje da će dati porast indeksa stimulacije (SI) ≥ 1,6 u odnosu na negativnu kontrolnu skupinu. Dozu pozitivne kontrole treba odabrati tako da ne uzrokuje prekomjerno nadraživanje kože ili sustavnu toksičnost i da je indukcija ponovljiva, ali ne prekomjerna (tj. SI > 14 se smatra pretjeranim). Poželjne pozitivne kontrole su 25 %-tni heksilcinamaldehid (CAS br. 101-86-0) i 25 %-tni eugenol (CAS br. 97-53-0) u acetonu: maslinovo ulje (4:1; v/v). Moguće su okolnosti u kojima se, uz odgovarajuće obrazloženje, mogu koristiti druge pozitivne kontrole koje ispunjavaju gore navedene kriterije.

12. Iako se preporučuje uvođenje paralelne skupine pozitivne kontrole, u određenim situacijama periodičko ispitivanje (tj. u intervalima ≤ 6 mjeseci) pozitivne kontrole može biti prikladno za laboratorije koji redovito izvode metodu LLNA: BrdU-ELISA (tj. najmanje jednom mjesečno) i imaju povijesnu bazu podataka pozitivne kontrole koja dokazuje sposobnost laboratorija da dobiva ponovljive i točne rezultate pozitivnih kontrola. Odgovarajuća osposobljenost za metodu LLNA: BrdU-ELISA može se uspješno dokazati dobivanjem dosljednih pozitivnih rezultata pozitivne kontrole u najmanje deset neovisnih ispitivanja provedenih u razumnom vremenskom razdoblju (manje od jedne godine).

13. Paralelnu skupinu pozitivne kontrole potrebno je uvesti svaki put kada dođe do proceduralne promjene metode LLNA: BrdU-ELISA (npr. zamjena stručnog osoblja, promjena materijala i/ili reagensa ispitne metode, promjena opreme, promjena izvora ispitivanih životinja) i te se promjene moraju navesti u laboratorijskim izvješćima. Potrebno je uzeti u obzir učinak tih promjena na primjerenost prethodno uspostavljene povijesne baze podataka prilikom utvrđivanja potrebe za uspostavom nove baze povijesnih podataka radi dokazivanja dosljednosti rezultata pozitivne kontrole.

14. Istraživači trebaju biti svjesni da odluka o provođenju periodičke umjesto paralelne studije pozitivne kontrole utječe na prikladnost i prihvatljivost negativnih rezultata dobivenih bez paralelne pozitivne kontrole u razdoblju između svake periodičke pozitivne kontrole. Na primjer, ako se periodičkom pozitivnom kontrolom dobije lažni negativni rezultat, mogu se dovesti u pitanje negativni rezultati ispitivane tvari dobiveni u razdoblju između posljednje prihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije i neprihvatljive periodičke pozitivne kontrolne studije. Kod odlučivanja o uvođenju paralelne pozitivne kontrole ili provođenju samo periodičkih pozitivnih kontrola potrebno je pažljivo uzeti u obzir posljedice tih rezultata. Također je potrebno razmotriti mogućnost uporabe manjeg broja životinja u skupini paralelne pozitivne kontrole ako je to opravdano sa znanstvenog stajališta i ako laboratorij na temelju svojih posebnih povijesnih podataka dokaže da se može koristiti manje miševa (17).

15. Iako pozitivnu kontrolnu tvar treba ispitati u nosaču za koji je poznato da izaziva dosljednu reakciju (npr. aceton; maslinovo ulje; 4:1, v/v), u nekim regulatornim situacijama bit će potrebno i ispitivanje u nestandardnom nosaču (klinički/kemijski relevantnoj formulaciji) (18). Ako se paralelna pozitivna kontrola ispituje u drugačijem nosaču od ispitivane tvari, potrebno je uključiti posebnu kontrolu s nosačem za paralelnu pozitivnu kontrolu.

▼M3

16. U slučajevima kada se ocjenjuju tvari iz posebnog kemijskog razreda ili raspona reakcija, referentne tvari mogu također biti korisne za dokazivanje ispravnosti ispitne metode za otkrivanje potencijala preosjetljivosti kože tih vrsta ispitivanih tvari. Prikladne referentne tvari moraju imati sljedeće značajke:

— strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom ispitivane tvari,

— poznata fizikalna/kemijska svojstva,

— popratne podatke iz LLNA: BrdU-ELISA,

— popratne podatke od drugih životinjskih modela i/ili ljudi.

ISPITNI POSTUPAK

Broj životinja i visine doze

17. Po jednoj dozirnoj skupini koriste se najmanje četiri životinje s najmanje tri koncentracije ispitivane tvari, plus paralelna negativna kontrolna skupina tretirana samo nosačem za ispitivanu tvar i jedna pozitivna kontrola (paralelna ili nedavno provedena, na temelju laboratorijske politike uzimajući u obzir stavke 11.-15.). Potrebno je razmotriti ispitivanje višestrukih doza pozitivne kontrole, posebno ako se ispitivanje pozitivne kontrole izvodi s prekidima. Osim tretiranja ispitivanom tvari, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati i tretirati ih jednako kao i životinje u tretiranim skupinama.

18. Odabir doze i nosača treba se temeljiti na preporukama navedenim u referencama (2) i (19). Uzastopne doze se obično odabiru iz odgovarajućih serija koncentracija kao što su 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Odabir uporabljene serije koncentracija mora biti popraćen odgovarajućim znanstvenim obrazloženjem. Kod odabira tri uzastopne koncentracije treba uzeti u obzir sve postojeće toksikološke podatke (o akutnoj toksičnosti i nadraživanju kože) te strukturne i fizikalno-kemijske podatke o odnosnoj ispitivanoj tvari (i/ili strukturno povezanim tvarima), ako dostupne, kako bi se najvišom koncentracijom maksimaliziralo izlaganje, ali istodobno izbjegla sustavna toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (19) (20 i poglavlje B.4 iz ovog Priloga). U nedostatku tih podataka može biti potrebno provesti početno predprobiranje (vidjeti stavke 21.-24.).

19. Nosač ne smije ometati niti utjecati na rezultate ispitivanja i treba se odabrati na temelju povećanja topljivosti s ciljem postizanja što viših koncentracija, a da se istodobno proizvede otopina/suspenzija pogodna za primjenu ispitivane tvari. Kao nosači preporučuju se aceton: maslinovo ulje (4:1 v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol i dimetil sulfoksid (6), ali mogu se koristiti i drugi ako se to dostatno znanstveno obrazloži. U nekim situacijama može biti potrebno primijeniti klinički relevantno otapalo ili komercijalnu formulaciju u kojoj se ispitivana tvar prodaje, kao dodatnu kontrolu. Posebno treba paziti da u sustav nosača budu ugrađene hidrofilne ispitivane tvari koje vlaže kožu i ne isušuju se odmah, uključivanjem odgovarajućih sredstava za otapanje (npr. 1 %-tnim Pluronic® L92). Znači, nosače koji su u potpunosti vodeni treba izbjegavati.

▼M3

20. Obrada limfnih čvorova pojedinačnih miševa omogućuje ocjenjivanje promjenljivosti među životinjama i statističku usporedbu razlika između mjerenja ispitivanom tvari i kontrolnom skupinom s nosačem (vidjeti stavak 33.). Pored toga, ocjenjivanje mogućnosti smanjenja broja miševa u skupini pozitivne kontrole je izvedivo nakon što se prikupe pojedinačni podaci o životinjama (17). Određena regulatorna tijela zahtijevaju da se prikupe pojedinačni podaci o životinjama. Redovito prikupljanje pojedinačnih podataka o životinjama osigurava prednosti za dobrobit životinja, tako što se izbjegava dvostruko ispitivanje koje bi bilo potrebno, ako bi regulatorna tijela kasnije razmatrala rezultate, izvorno prikupljene na jedan način (npr. preko grupnih podataka o životinjama), zajedno s drugim zahtjevima (npr. pojedinačni podaci o životinjama).

Predprobiranje

21. Ako nisu dostupne informacije za određivanje najviše doze za ispitivanje (vidjeti stavak 18.) potrebno je obaviti predprobiranje kako bi se odredila odgovarajuća visina doze za ispitivanje u LLNA: BrdU-ELISA. Svrha predprobiranja je pružiti smjernice za odabir najviše doze za uporabu u glavnoj studiji LLNA: BrdU-ELISA, ako nisu dostupne informacije o koncentraciji koja uzrokuje sustavnu toksičnost (vidjeti stavak 24.) i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože (vidjeti stavak 23.). Najveća ispitana visina doze je 100 %-tna koncentracija ispitivane tvari za tekućine ili najveća moguća koncentracija za krute tvari ili suspenzije.

22. Predprobiranje se izvodi u uvjetima koji su identični glavnoj studiji LLNA: BrdU-ELISA, s razlikom da se ne ocjenjuje proliferacija limfnih čvorova i može se koristiti manje životinja po dozirnoj skupini. Preporučuje se uporaba jedne ili dvije životinje po dozirnoj skupini. Svi miševi se svakodnevno prate s ciljem otkrivanja kliničkih znakova sustavne toksičnosti ili lokalnog nadraživanja na mjestu primjene. Tjelesna masa se bilježi prije ispitivanja i prije završetka (6. dan). Oba uha svakog miša se pregledavaju radi otkrivanja eritema i boduju prema tablici 1. (20 i poglavlje B.4 iz ovog Priloga). Debljina uha se mjeri posebnim mjernim instrumentom (npr. digitalnim mikrometrom ili mjeračem debljine Peacock Dial) prvi dan (prije doze), treći dan (otprilike 48 sati nakon prve doze) i šesti dan. Pored toga, šesti dan se debljina uha može odrediti mjerenjem mase uzorka uha dobivenog probijanjem, što se izvodi nakon humanog usmrćenja. Prekomjerno lokalno nadraživanje kože se označuje bodovima za eriteme ≥ 3 i/ili povećanjem debljine uha za ≥ 25 % na bilo koji dan mjerenja (21) (22). Najviša odabrana doza za glavnu studiju LLNA: BrdU-ELISA je sljedeća niža doza iz serije koncentracija u predprobiranju (vidjeti stavak 18.) koja ne uzrokuje sustavnu toksičnost i/ili prekomjerno lokalno nadraživanje kože.

Tablica 1.

Bodovanje eritema

Zapažanja	Bodovi
Bez eritema	0
Vrlo slabi eritem (jedva zamjetan)	1
Dobro vidljiv eritem	2

▼M3

Zapažanja	Bodovi
Umjeren do jak eritem	3
Jak eritem (crvenilo cikle) do nekroze kože što onemogućuje stupnjevanje eritema	4

23. Pored 25 %-tnog povećanja debljine uha (21)(22), statistički značajno povećanje debljine uha kod tretiranih miševa u odnosu na kontrolne miševe se, također, koristi za određivanje nadražujućih tvari u LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Međutim, iako se statistički značajna povećanja debljine uha mogu javiti, ona se posebno ne povezuju s prekomjernim nadraživanjem kada su manja od 25 % (25) (26) (27) (28) (29).

24. Sljedeća klinička opažanja mogu ukazivati na sustavnu toksičnost (30) kada se koriste u okviru cjelokupne ocjene te stoga mogu naznačiti najvišu dozu za uporabu u glavnoj LLNA: BrdU-ELISA: promjene u djelovanju živčanog sustava (npr. piloerekcija, ataksija, tremori i grčevi); promjene u ponašanju (npr. agresivnost, promjene u njezi, značajna promjena u stupnju aktivnosti); promjene u disanju (npr. promjene učestalosti i intenziteta disanja kao što su dispneja, zadihanost i hroptanje) i promjene u konzumaciji hrane i vode. Prilikom ocjenjivanja treba uzeti u obzir znakove letargije i/ili nereagiranja, sve kliničke znakove boli i patnje koji nisu blagi ili trenutačni, ili gubitak težine > 5 % od prvog do šestog dana i smrtnost. Životinje koje su pred uginućem ili pokazuju znakove teške boli i patnje trebaju se humano usmrtiti (31).

Plan pokusa glavne studije

25. Plan pokusa je sljedeći:

— *Prvi dan:* Pojedinačno identificirati životinje i zabilježiti masu svake životinje i sva klinička opažanja. Primijeniti 25 µl odgovarajuće otopine ispitivane tvari, samog nosača ili pozitivne kontrole (paralelna ili nedavno provedena, ovisno o laboratorijskoj politici uzimajući u obzir stavke 11.-15.) na stražnji dio svakog uha.

— *Drugi i treći dan:* Ponoviti postupak primjene proveden prvog dana.

— *Četvrti dan:* Bez tretiranja.

— *Peti dan:* Intraperitonealno ubrizgavanje 0,5 ml (5 mg/miš) otopine BrdU (10 mg/ml).

— *Šesti dan:* Zabilježiti masu svake životinje i sva klinička opažanja. Otprilike 24 sata (24 h) nakon ubrizgavanja BrdU životinje humano usmrtiti. Izrezati drenažne aurikularne limfne čvorove iz svakog uha i staviti odvojeno u pufer PBS za svaku životinju. Pojedinosti i sheme za identifikaciju i disekciju limfnih čvorova mogu se naći u referenci (17). Za daljnje praćenje lokalne reakcije kože u glavnoj studiji mogu se u protokol studije uključiti dodatni parametri kao što su ocjenjivanje eritema ušiju ili mjerenja debljine uha (dobiveni uređajem za mjerenje debljine ili određivanjem mase uzorka uha pri obdukciji).

▼M3

Priprema suspenzije stanica

26. Suspenzija pojedinačnih stanica limfnih čvorova (LNC) svakog miša, odstranjenih bilateralno, priprema se blagom mehaničkom dezagregacijom kroz žičanu mrežu od nehrđajućeg čelika s otvorima od 200 mikrona ili drugom prihvatljivom tehnikom za dobivanje suspenzije pojedinačne stanice (npr. uporabom plastičnog tučka za jednokratnu uporabu za drobljenje limfnih čvorova, nakon čega slijedi filtriranje kroz najlonsku mrežu s otvorima od 70 mikrona). Postupak pripreme suspenzije LNC je kritičan za ovu analizu te, stoga, svaki izvođač mora prethodno steći tu vještinu. Limfni čvorovi životinja u negativnoj kontroli su mali te je, stoga, s njima važno pažljivo rukovati da ne dođe do umjetnog učinka na vrijednosti SI. U svakom slučaju ciljani obujam suspenzije LNC treba se prilagoditi utvrđenom optimiziranom obujmu (približno 15 ml). Optimizirani obujam temelji se na postizanju prosječne apsorbance negativne kontrolne skupine u rasponu 0,1–0,2.

Određivanje proliferacije stanica (mjerenje sadržaja BrdU u DNA limfocita)

27. BrdU se mjeri testom ELISA koristeći trgovački komplet (npr. Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka, br. u katalogu 11 647 229 001). Ukratko u jažice mikroploča s ravnim dnom doda se 100 µL suspenzije LNC u tri primjerka. Nakon fiksacije i denaturacije LNC u svaku se jažicu dodaje anti-BrdU protutijelo i omogući reakcija. Potom se anti-BrdU protutijelo ukloni ispiranjem, doda se otopina supstrata i omogući nastanak kromogena. Potom se izmjeri apsorbanca pri 370 nm s referentnom valnom duljinom 492 nm. U svakom slučaju ispitni uvjeti analize moraju biti optimizirani (vidjeti stavak 26.).

OPAŽANJA

Klinička opažanja

28. Sve miševe treba pomno opažati najmanje jednom dnevno s obzirom na sve kliničke znakove bilo lokalnog nadraživanja na mjestu primjene ili sustavne toksičnosti. Sva opažanja sustavno se bilježe za svaku životinju. Programi praćenja uključuju kriterije za pravodobno identificiranje miševa koji pokazuju znakove sustavne toksičnosti, prekomjernog lokalnog nadraživanja kože ili korozije kože za eutanaziju (31).

Tjelesne mase

29. Kao što je navedeno u stavku 25., pojedinačne tjelesne mase treba mjeriti na početku testa i u vrijeme planiranog usmrćivanja životinja.

IZRAČUN REZULTATA

30. Rezultati za svaku tretiranu skupinu su izraženi kao prosječni indeks stimulacije (SI). SI se dobiva dijeljenjem prosječnog indeksa označivanja BrdU po životinji unutar svake skupine tretirane ispitivanom tvari i pozitivne kontrolne skupine s prosječnim indeksom označivanja BrdU za kontrolnu skupinu otopine/nosača. Prosječan SI za kontrolne skupine tretirane nosačem tada iznosi 1.

Indeks označivanja BrdU se određuje kako slijedi:

$$\text{indeks označivanja BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

pri čemu: em = valna duljina emisije; i ref = referentna valna duljina.

▼M3

31. U postupku odlučivanja rezultat se smatra pozitivnim kada je SI ≥ 1,6 (10). Međutim, kod odlučivanja da se neki granični rezultat (tj. vrijednost SI između 1,6 i 1,9) proglasi pozitivnim može se također koristiti snaga učinka na dozu, statistički značaj i dosljednost reakcija u otapalu/nosaču i pozitivnoj kontroli (3 (6) (32).

32. U slučaju graničnog pozitivnog rezultata s vrijednošću SI između 1,6 i 1,9, za potvrđivanje pozitivnog rezultata korisnici mogu, pored vrijednosti SI, uzeti u obzir i dodatne podatke kao što je odnos između doze i reakcije, dokaz sustavne toksičnosti ili prekomjerne nadraženosti i, prema potrebi, statistički značaj (10). Potrebno je također uzeti u obzir razna svojstva ispitivane tvari, uključujući i to ima li strukturne veze s poznatim senzibilizatorima kože, uzrokuje li pretjerano nadraživanje kože kod miševa i prirodu odnosa opažene reakcije na dozu. Ova i druga pitanja detaljno su razmotrena drugdje (4).

33. Prikupljanje podataka na razini pojedinačnog miša omogućit će statističku analizu prisutnosti i stupnja odnosa između doze i učinka. Svaka statistička procjena može uključiti ocjenu odnosa između doze i učinka te odgovarajući prilagođene usporedbe ispitnih skupina (npr. skupina s doziranjem u parovima u odnosu na paralelne kontrolne skupine s otapalom/nosačem). Statističke analize mogu uključiti linearnu regresiju ili Williamsov test za ocjenu trendova odnosa doza-učinak i Dunnettov test za usporedbe u parovima. Prilikom odabira prikladne metode statističke analize istraživač treba biti svjestan eventualnih razlika između varijanata kao i drugih problema s tim u vezi, zbog kojih može biti neophodna transformacija podataka ili neparametarska statistička analiza. U svakom slučaju istraživač će možda morati izvršiti izračune SI i statističke analize sa i bez sigurnih točaka podataka (koji se ponekad nazivaju „netipične vrijednosti”).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

34. Podatke treba sažeti u tabličnom obliku koji pokazuje vrijednosti indeksa označivanja BrdU za pojedinačnu životinju, prosječni indeks označivanja BrdU po životinji za skupinu, s tim povezane pogreške (npr. SD, SEM) i prosječni SI za svaku dozirnu skupinu u odnosu na paralelnu kontrolnu skupinu s otapalom/nosačem.

Izvješće o ispitivanju

35. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane i kontrolne tvari:

— identifikacijski podaci (npr. brojevi CAS i EZ, ako poznati, podrijetlo, čistoća, poznate nečistoće, broj šarže),

— fizikalna priroda i fizikalno-kemijska svojstva (npr. hlapljivost, stabilnost, topljivost),

— ako je mješavina, sastav i relativni postoci sastojaka.

Otapalo/nosač:

— identifikacijski podaci (čistoća, koncentracija (prema potrebi); upotrijebljeni volumen),

— dokaz opravdanosti izbora nosača.

▼M3

Ispitne životinje:

— podrijetlo miševa CBA,

— mikrobiološki status životinja, ako je poznat,

— broj i starost životinja,

— podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Uvjeti ispitivanja:

— podrijetlo, broj šarže i podaci proizvođača o osiguranju kakvoće/kontroli kakvoće za komplet ELISA (osjetljivost na protutijela i specifičnost te granica opažanja),

— pojedinosti o pripravljanju i primjeni ispitivane tvari,

— dokaz opravdanosti odabira doze (uključujući rezultate predprobiranja, ako je provedeno),

— koncentracije nosača i ispitivane tvari koji su upotrijebljeni i ukupna količina ispitivane tvari koja je primijenjena,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući vrstu/podrijetlo hrane, izvor vode),

— pojedinosti o programima tretiranja i uzorkovanja,

— metode mjerenja toksičnosti,

— kriteriji za određivanje studija pozitivnima ili negativnima,

— pojedinosti o bilo kojim odstupanjima od protokola i objašnjenje učinaka tog odstupanja na izradu i rezultate studije,

Provjera pouzdanosti:

— sažetak rezultata najsvježije provjere pouzdanosti uključujući informacije o upotrijebljenoj ispitanoj tvari, koncentraciji i nosaču,

— podaci o paralelnim i/ili povijesnim pozitivnim kontrolama i paralelnim negativnim kontrolama (s otapalom/nosačem) za ispitni laboratorij,

— ako nije uključena paralelna pozitivna kontrola, datum i laboratorijsko izvješće za posljednju periodičku pozitivnu kontrolu i izvješće u kojem se navode povijesni pozitivni kontrolni podaci za laboratorij, kojima se opravdava neprovođenje paralelne pozitivne kontrole,

Rezultati:

— pojedinačne mase miševa na početku doziranja i u vrijeme planiranog usmrćenja, srednja i povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za svaku tretiranu skupinu,

— vrijeme prve pojave i znakova toksičnosti, uključujući eventualno nadraživanje kože na mjestu primjene, za svaku životinju,

— tablica indeksa označivanja BrdU za pojedinačne miševe i vrijednosti SI za svaku tretiranu skupinu,

— srednja i povezana razlika između stvarne i predviđene pogreške (npr. SD, SEM) za indeks označivanja BrdU/miš za svaku tretiranu skupinu i rezultati analize netipičnih vrijednosti za svaku tretiranu skupinu,

▼M3

— izračunani SI i prikladno mjerilo promjenljivosti koje uzima u obzir promjenljivost između životinja u ispitivanoj tvari i kontrolnim skupinama,

— odnos doza – reakcija,

— statistička analiza, ako je primjereno,

Rasprava o rezultatima:

— kratki komentar o rezultatima, analiza doza-reakcije, i prema potrebi, statističke analize, sa zaključkom o tome treba li ispitivanu tvar smatrati senzibilizatorom kože.

REFERENCE

1. OECD (2010.), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996.), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, str. 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996.), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, str. 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998.), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, str. 327-33.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000.), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, str. 49-59.

6. ICCVAM (1999.), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), str. 258-273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), str. 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001.), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), str. 249-257.

10. ICCVAM (2010.), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

11. ICCVAM (2009.), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005.), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, str. 129-134.

13. OECD (1992.), Skin Sensitisation, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

14. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008.), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, str. 1896-1904.

15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009.), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, str. 90-96.

16. ILAR (1996.), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17. ICCVAM (2009.), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

18. McGarry, H.F. (2007.), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, str. 71-89.

19. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994.), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, str. 13-31.

20. OECD (2002.), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

21. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007.), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, str. 235.

22. ICCVAM (2009.), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

23. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998.), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, str. 195-206.

24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998.), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, str. 83-94.

25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998.), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, str. 245-256.

▼**M3**

26. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999.), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, str. 491-506.

27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005.), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, str. 60-68.

28. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005.), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, str. 721-728.

29. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007.), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, str. 1023-1028.

30. ICCVAM (2009.), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupno na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

31. OECD (2000.), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998.), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, str. 563-79.

33. OECD (2005.), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Ovaj se termin često koristi umjesto „podudarnosti" kako bi se označio udio točnih rezultata ispitne metode (33).

Referentna tvar: tvar koja uzrokuje ili ne uzrokuje preosjetljivost i koja se koristi kao standard za usporedbu s ispitivanom tvari. Referentna tvar treba imati sljedeće svojstva: i. dosljedni i pouzdani izvor(i); ii. strukturna i funkcionalna sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznate fizikalno-kemijske značajke; iv. popratni podaci o poznatim učincima; i v. poznata učinkovitost u okviru željene reakcije.

Lažno negativna tvar: tvar koja je ispitnom metodom netočno određena kao negativna ili neaktivna kada je u stvari pozitivna ili aktivna (33).

Lažno pozitivna tvar: tvar koja je ispitivanjem netočno određena kao pozitivna ili aktivna kada je u stvari negativna ili neaktivna (33).

Opasnost: potencijal štetnog učinka na zdravlje ili okoliš. Štetni učinak se javlja samo ako je stupanj izloženosti dovoljno visok.

Ponovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji koji koriste isti protokol i ispituju istu tvar, mogu proizvesti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate. Ponovljivost između laboratorija određuje se prije i tijekom validacijskog postupka i pokazuje u kojoj se mjeri neko ispitivanje može uspješno prenijeti iz jednog laboratorija u drugi, također navedena kao međulaboratorijska ponovljivost (33).

Ponovljivost u laboratoriju: određivanje u kojoj mjeri stručno osoblje u okviru istog laboratorija može uspješno ponoviti rezultate koristeći određeni protokol u različitim trenucima. Također se navodi kao unutarlaboratorijska ponovljivost (33).

Netipična vrijednost: netipična vrijednost je zapažanje koje značajno odstupa od ostalih vrijednosti u nasumičnom uzorku populacije.

Osiguranje kvalitete: postupak upravljanja pri kojem pojedinci neovisni od osoba koje provode ispitivanje, ocjenjuju ispunjavanje standarda laboratorijskog ispitivanja, zahtjeve i postupke vođenja evidencije te točnost prijenosa podataka.

Pouzdanost: mjera u kojoj se ispitna metoda može ponoviti unutar i između laboratorija tijekom vremena uporabom istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem unutarlaboratorijske i međulaboratorijske ponovljivosti (33).

Preosjetljivost kože: imunološki proces koji se javlja kada je osjetljivi pojedinac lokalno izložen kemijskom alergenu koji uzrokuje imunosnu reakciju kože koja može dovesti do kontaktne preosjetljivosti.

Indeks stimulacije (SI): izračunana vrijednost za ocjenjivanje potencijala preosjetljivosti kože koju može uzrokovati ispitivana tvar, koja je omjer proliferacije u tretiranim skupinama i paralelnoj kontrolnoj skupini s nosačem.

Ispitivana tvar (navodi se također kao i ispitivana kemikalija): svaka tvar ili smjesa koja je ispitana ovom metodom.

▼M4

B.52. AKUTNA INHALACIJSKA TOKSIČNOST - METODA AKUTNOG TOKSIČNOG RAZREDA

UVOD

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 436 (2009.). Prva smjernica o akutnoj inhalaciji TG 403 usvojena je 1981. i otada je revidirana (vidjeti Poglavlje B.2 ovog Priloga (1)). Za razvoj metode inhalacijskog akutnog toksičnog razreda (ATC) (2) (3) (4) smatralo se prikladnim slijediti usvajanje revidirane oralne metode ATC (Poglavlje B.1 tris ovog Priloga) (5). Utvrđivanje restropektivnog djelovanja ispitne metode ATC za akutnu inhalacijsku toksičnost pokazalo je da je metoda prikladna za primjenu u svrhu razvrstavanja i označivanja (6). Ispitna metoda inhalacije ATC omogućit će primjenu serijskih koraka koncentracija ciljane mete za određivanje ranga toksičnosti ispitivane kemikalije. Smrtnost se upotrebljava kao konačni učinak, ali životinje u teškoj patnji ili stresu koje ugibaju ili kojima prijeti ugibanje treba humano usmrtiti kako bi se smanjila patnja. Smjernica o humanom usmrćivanju dostupna je u OECD-ovoj Smjernici br. 19. (7).

2. Upute za provođenje i tumačenje ove ispitne metode mogu se pronaći u Smjernici br. 39. za ispitivanje akutne inhalacijske toksičnosti (GD 39) (8).

3. Definicije upotrijebljene u kontekstu ove ispitne metode nalaze se u Dodatku 1. i Smjernici 39. (8).

4. Ispitna metoda pruža informacije o opasnim svojstvima i omogućuje rangiranje i razvrstavanje ispitivane kemikalije u skladu s Uredbom (EZ) br. 1272/2008 za razvrstavanje kemikalija koje uzrokuju akutnu toksičnost (9). U slučaju da su potrebne početne procjene vrijednosti LC_{50} ili analize reakcije na koncentraciju treba upotrijebiti Pglavlje B.2 ovog Priloga (1) kao odgovarajuću ispitnu metodu. Ostale upute za odabir ispitne metode mogu se pronaći u GD 39 (8). Ova ispitna metoda nije specifično namijenjena za ispitivanje specijaliziranih materijala, poput slabo topljivih izometrijskih ili vlaknastih materijala ili proizvedenih nanomaterijala.

UVODNA RAZMATRANJA

5. Kako bi se na minimum svela uporaba životinja, prije razmatranja ispitivanja u skladu s ovom ispitnom metodom laboratorij koji provodi ispitivanje u obzir treba uzeti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji, uključujući postojeće studije čiji bi podaci opravdali neprovođenje dodatnih ispitivanja. Informacije koje mogu pomoći u odabiru najprikladnijih vrsta, sojeva, spola, načina izlaganja i prikladnih ispitnih koncentracije obuhvaćaju identitet, kemijsku strukturu te fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije; rezultate bilo kakvih ispitivanja toksičnosti *in vitro* ili *in vivo*; očekivanu(e) uporabu(e) i potencijal za izlaganje ljudi; dostupne podatke (Q)SAR i toksikološke podatke o tvarima srodne strukture. Koncentracije za koje se očekuje da izazivaju tešku patnju i stres zbog nagrizajućeg ([1]) ili ozbiljno nadražujućeg djelovanja ne treba ispitivati ovom ispitnom metodom [vidjeti GD 39 (8)].

([1]) Vrednovanje nagrizanja može se temeljiti na stručnoj procjeni uz primjenu dokaza kao što su: ljudsko i životinjsko iskustvo, postojeći podaci (in vitro), npr. Poglavlje B.40 (10), B.40 bis (11) ovog Priloga ili OECD-ove TG 435 (12), pH vrijednosti, informacije dobivene od sličnih kemikalija ili bilo kakvih drugih primjerenih podataka.

▼M4

NAČELO ISPITIVANJA

6. Načelo je ispitivanja da se na temelju postupka korak po korak prikuplja dovoljna količina informacija o akutnoj inhalacijskoj toksičnosti ispitivane kemikalije tijekom razdoblja izlaganja od 4 sata kako bi se omogućilo njezino razvrstavanje. Ostala trajanja izlaganja mogu se primijeniti u specifične regulatorne svrhe. U svakom od definiranih koraka koncentracije ispituju se po tri životinje svakog spola. Ovisno o boležljivosti i/ili stupnju ugibanja životinja mogu biti dovoljna dva koraka za omogućenje prosudbe o akutnoj toksičnosti ispitivane kemikalije. Ako postoji dokaz da je jedan spol osjetljiviji od drugog, ispitivanje se može nastaviti samo s osjetljivijim spolom. Ishod prethodnog koraka odredit će sljedeći korak da bude kako slijedi:

(a) Nije potrebno daljnje ispitivanje,

(b) Ispitivanje triju životinja svakog spola ili

(c) Ispitivanje sa šest životinja osjetljivijeg spola, tj. procjena najniže granice razreda toksičnosti treba se temeljiti na šest životinja po ispitnoj skupini i ispitnoj koncentracije neovisno o spolu.

7. Životinje koje ugibaju ili životinje koje očito pate ili pokazuju znakove ozbiljnog i trajnog stresa treba humano usmrtiti i u tumačenju rezultata ispitivanja tretirati jednako kao i životinje uginule pri ispitivanju. Kriteriji za odlučivanje o usmrćivanju životinja u stanju ugibanja ili koje teško pate te upute o prepoznavanju predvidive ili prijeteće smrti predmet su Smjernice za humano usmrćivanje br. 19. OECD-a (7).

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

8. Treba upotrijebiti zdrave, mlade odrasle životinje sojeva koji se obično koriste u laboratorijima. Preferirane vrsta je štakor, a u slučaju uporabe drugih vrsta treba dati obrazloženje.

Priprema životinja

9. Treba upotrebljavati ženke koje još nisu imale potomstvo i nisu gravidne. Na dan izlaganja životinje moraju biti mlade odrasle jedinke između 8 i 12 tjedana starosti, srednje vrijednosti tjelesne mase u granicama od ± 20 % za svaki spol bilo koje prethodno izložene životinje jednake dobi. Životinje se odabiru nasumice i označavaju radi pojedinačne identifikacije. Životinje se drže u kavezima najmanje pet dana prije početka ispitivanja kako bi im se omogućila aklimatizacija na laboratorijske uvjete. Životinje također treba aklimatizirati na ispitnu aparaturu kratko vrijeme prije ispitivanja jer će se tako smanjiti stres izazvan uvođenjem u novu okolinu.

Uzgoj životinja

10. Temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi iznositi 22 ± 3 °C. Relativna vlažnost zraka idealno bi se morala održavati u intervalu od 30 do 70 % iako to možda neće biti moguće ako se kao nosač primjenjuje voda. Prije i nakon izlaganja životinje općenito treba smjestiti u kaveze u skupinama po spolu i koncentraciji, ali broj životinja po kavezu ne smije ometati jasna opažanja svake životinje i tako se trebaju na minimum svesti gubici zbog kanibalizma i borbe. Ako izlaže samo nos životinja, može biti potrebno aklimatizirati životinje na cijevi koje ih sputavaju. Cijevi koje sputavaju životinje ne smiju im nametnuti pretjeran fizički, toplinski ili imobilizacijski stres. Sputavanje može utjecati na fiziološke krajnje učinke, poput tjelesne temperature (hipertermija) i/ili respiratornog

▼M4

minutnog volumena. Ako su dostupni generički podaci koji pokazuju da se takve promjene ne događaju u znatnom opsegu, nije potrebna prethodna prilagodba cijevima koje sputavaju. Životinje, koje su cijelim tijelom izložene aerosolu, tijekom izlaganja treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječilo da se ispitivani aerosol filtrira kroz krzno drugih životinja u istom kavezu. Može se upotrijebiti konvencionalna i certificirana laboratorijska prehrana, osim tijekom izlaganja, u kombinaciji s neograničenom zalihom javne pitke vode. Rasvjeta mora biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati tame.

Komore za inhalaciju

11. Pri odabiru komore za inhalaciju u obzir valja uzeti narav ispitivane kemikalije i cilj ispitivanja. Prednost se daje izlaganju samo nosom (koje uključuje samo glavu, samo nos ili samo njušku). Izlaganju samo nosom općenito se daje prednost za ispitivanja tekućih ili krutih aerosola te para koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Posebni ciljevi ispitivanja mogu se bolje postići uporabom izlaganja čitavog tijela, ali to treba opravdati u izvješću o ispitivanju. Kako bi se osigurala stabilnost atmosfere u slučaju primjene komore za čitavo tijelo, ukupni volumen pokusnih životinja ne smije premašiti 5 % volumena komore. Načela tehnika izlaganja samo nosom i čitavim tijelom te njihove specifične prednosti i nedostaci opisani su u GD 39 (8).

UVJETI IZLAGANJA

Primjene koncentracija

12. Preporučuje se fiksno trajanje izlaganja od četiri sata koje ne uključuje vrijeme uravnoteženja. Druga trajanja mogu biti potrebna radi ispunjavanja određenih zahtjeva, međutim, u izvješću o studiji treba pružiti obrazloženje [vidjeti GD 39. (8)]. Životinje izložene u komorama za izlaganje čitavim tijelom treba smjestiti pojedinačno kako bi se spriječila apsorpcija ispitivane kemikalije zbog njegovanja životinja u istom kavezu. Tijekom izlaganja treba obustaviti hranjenje. Voda se može davati tijekom cijelog izlaganja čitavim tijelom.

13. Životinje se izlažu ispitivanoj kemikaliji u vidu plina, pare, aerosola ili njihovih smjesa. Fizikalno stanje koje će se ispitivati ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, odabranoj koncentraciji i/ili fizikalnom obliku koji je obično prisutan tijekom manipulacije ispitivanom kemikalijom i njezine uporabe. Higroskopske i kemijski reaktivne ispitivane kemikalije treba ispitivati u uvjetima suhog zraka. Treba paziti kako bi se izbjeglo stvaranje eksplozivnih koncentracija.

Distribucija veličine čestica

14. Određivanje veličine čestica treba provesti za sve aerosole i pare koje se mogu kondenzirati iz aerosola. Kako bi se omogućilo izlaganje svih relevantnih područja respiratornog trakta, preporučuje se aerosol srednjeg aerodinamičkog promjera čestica (MMAD) u rasponu od 1 do 4 μm s geometrijskom standardnom devijacijom (σ_g) u rasponu od 1,5 do 3,0 (8) (13) (14). Iako treba uložiti razuman napor za postizanje tih standarda, ako se isti ne mogu postići, treba dati stručno mišljenje. Primjerice, isparine metala mogu biti manje od tog standarda, a čestice, vlakna i higroskopni materijali pod nabojeme (čija se veličina povećava u vlažnom okolišu respiratornog trakta) mogu premašiti taj standard.

▼M4

Priprema ispitivane kemikalije u nosaču

15. Za stvaranje odgovarajuće koncentracije i veličine čestica ispitivane kemikalije u atmosferi može se upotrijebiti nosač. U pravilu se prednost daje vodi. Materijali u česticama mogu se podvrgnuti mehaničkim procesima kako bi se postigla potrebna distribucija veličine čestica, no treba paziti da se ispitivana kemikalija ne rastavi niti promijeni. U slučajevima u kojima se smatra da su mehanički procesi promijenili ispitivanu kemikaliju (npr. ekstremne temperature uslijed prekomjernog mljevenja zbog trenja) treba analitički provjeriti sastav ispitivane kemikalije. Treba primijeniti dovoljnu razinu opreza da se ne bi kontaminirala ispitivana kemikalija. Nije nužno ispitivati nedrobive granulirane materijale koji su namjerno oblikovani tako da se ne mogu inhalirati. Treba primijeniti test atricijom kako bi se dokazalo da se tijekom rukovanja granuliranim materijalom ne stvaraju čestice koje se mogu udahnuti. Ako se tijekom testa atricijom stvore tvari koje se mogu udahnuti, treba provesti test inhalacijske toksičnosti.

Kontrolne životinje

16. Nije potrebna paralelna negativna skupina (zrak). U slučaju primjene drugog nosača osim vode pri stvaranju ispitne atmosfere kontrolna skupina nosača treba se primijeniti samo ako nisu dostupni podaci o povijesnoj inhalacijskoj toksičnosti. Ako ispitivanje toksičnosti ispitivane kemikalije formulirane u nosaču ne pokaže nikakvu toksičnost, znači da nosač nije toksičan u ispitnoj koncentraciji te stoga nema potrebe za kontrolnim nosačem.

PRAĆENJE UVJETA IZLAGANJA

Protok zraka u komori

17. Protok zraka u komori treba pažljivo kontrolirati, neprestano pratiti te bilježiti najmanje jedanput svakog sata tijekom svakog izlaganja. Praćenje ispitne koncentracije (ili stabilnosti) u atmosferi sastavno je mjerenje svih dinamičkih parametara i pruža neizravno sredstvo za kontrolu svih relevantnih parametara za stvaranje dinamičke atmosfere. Treba posebno obratiti pozornost na izbjegavanje ponovnog udisanja u komorama za izlaganje samo nosom u slučajevima gdje je protok zraka kroz sustav za izlaganje neadekvatan za pružanje dinamičkog protoka atmosfere ispitivane kemikalije. Postoje propisane metodologije koje se mogu primijeniti kako bi se pokazalo da u odabranim uvjetima rada ne dolazi do ponovnog udisanja (8) (15). Koncentracija kisika mora iznositi najmanje 19 %, a koncentracija ugljikova dioksida ne smije premašivati 1 %. Ako postoji opravdana sumnja da se takvi standardi ne mogu postići, treba mjeriti koncentraciju kisika i ugljikova dioksida.

Temperatura i relativna vlažnost zraka u komori

18. Temperaturu u komori treba održavati na 22 ± 3 °C. Relativnu vlažnost zraka u zoni gdje životinje dišu, za izlaganja samo nosom i čitavim tijekom, treba pratiti i bilježiti najmanje tri puta tijekom izlaganja do četiri sata te jedanput svakog sata tijekom kraćih izlaganja. Relativnu vlažnost zraka trebalo bi idealno održavati u rasponu od 30 do 70 %, no to može biti nemoguće (npr. u slučaju ispitivanja smjesa na bazi vode) ili nemjerljivo zbog utjecanja na ispitivanu kemikaliju pomoću ispitne metode.

▼M4

Ispitivana kemikalija: nazivna koncentracija

19. Kad god je to moguće, treba izračunati i zabilježiti nazivnu koncentraciju u komori za izlaganje. Nazivna koncentracija jest masa proizvedene ispitivane kemikalije podijeljena s ukupnim volumenom zraka koji je prošao kroz sustav komore. Nazivna se koncentracija ne koristi za karakterizaciju izlaganja životinja nego usporedba nazivne koncentracije i stvarne koncentracije daje uvid u učinkovitost proizvodnje sustava ispitivanja te se stoga može upotrijebiti za otkrivanje problema pri proizvodnji.

Ispitivana kemikalija: stvarna koncentracija

20. Stvarna koncentracija jest koncentracija ispitivane kemikalije u zoni udisanja životinja u komori za inhalaciju. Stvarna koncentracija može se dobiti specifičnim metodama (npr. izravnim uzorkovanjem, apsorpcijskim ili kemijskim reaktivnim metodama te analitičkom karakterizacijom nakon toga) ili nespecifičnim metodama poput gravimetrijske analize filtra. Primjena gravimetrijske analize prihvatljiva je samo za aerosole sa samo jednom komponentom u prahu ili aerosole tekućina niskog stupnja hlapljivosti i treba je podržati odgovarajućom preliminarnom karakterizacijom specifičnom za ispitivanu kemikaliju. Gravimetrijskom analizom može se odrediti i koncentracija aerosola s višekomponentnim prahom. No, za to su potrebni analitički podaci koji pokazuju da je sastav materijala koji se prenosi zrakom sličan početnom materijalu. Ako ta informacija nije dostupna, potrebna je ponovna analiza ispitivane kemikalije (idealno u stanju kada se prenosi zrakom) u pravilnim intervalima tijekom ispitivanja. Za agense, pod utjecajem aerosola, koji mogu ispariti ili sublimirati treba pokazati da su odabranom metodom skupljene sve faze. U izvješću o ispitivanju treba navesti ciljanu, nazivnu i stvarnu koncentraciju, ali samo se stvarne koncentracije koriste u statističkim analizama za izračun vrijednosti smrtonosne koncentracije.

21. Ako je moguće, treba upotrijebiti jednu šaržu ispitivane kemikalije, a ispitivani uzorak treba skladištiti u uvjetima u kojima će biti očuvana njegova čistoća, homogenost i stabilnost. Prije početka studije treba odrediti svojstva ispitivane kemikalije, uključujući njezinu čistoću i, ako je tehnički izvedivo, identitet te količine identificiranih kontaminirajućih tvari i nečistoća. To se može pokazati sljedećim podacima, ali nije ograničeno na njih: vrijeme zadržavanja i relativno vršno područje, molekulska masa iz spektroskopskog mjerenja ili kromatografske analize plina ili sličnih procjena. Iako identitet ispitivanog uzorka nije odgovornost ispitnog laboratorija, za laboratorij može biti mudro barem u ograničenim okvirima potvrditi naručiteljevu karakterizaciju (npr. boju, fizikalnu narav itd.).

22. Atmosferu izlaganja treba održavati konstantnom koliko je to moguće i pratiti neprestano i/ili na mahove, ovisno o metodi analize. Ako se primjenjuje uzorkovanje na mahove, uzorke atmosfere u komori treba uzimati najmanje dvaput tijekom ispitivanja od četiri sata. Ako to nije izvedivo zbog ograničenog protoka zraka ili niskih koncentracija, tijekom čitavog razdoblja izlaganja može se uzeti jedan uzorak. Ako se pojave označene fluktuacije uzorak po uzorak, sljedeće ispitne koncentracije moraju upotrijebiti četiri uzorka po izlaganju. Pojedinačni uzorci koncentracije u komori ne smiju od srednje koncentracije u komori odstupati za više od ± 10 % za plinove i pare i ne za više od ± 20 % za tekućine ili kruti aerosol. Treba izračunati i zabilježiti vrijeme za postizanje ravnoteže u komori (t_{95}). Trajanje izlaganja proteže se kroz vrijeme proizvodnje ispitivane kemikalije, a to uzima u obzir vrijeme potrebno za postizanje t95. Smjernica za procjenu t_{95} može se pronaći u GD 39. (8).

▼M4

23. Za vrlo složene smjese koje se sastoje od plinova/para i aerosole (npr. zapaljive atmosfere i ispitivane kemikalije izbačene iz namjenskih proizvoda/uređaja za krajnju uporabu) svaka se faza može ponašati drukčije u komori za inhalaciju tako da treba odabrati najmanje jedan indikator (analiziranu tvar), obično glavnu aktivnu tvar u smjesi, svake faze (plin/para i aerosol). Kada je ispitivana kemikalija smjesa, treba izvijestiti o analitičkoj koncentraciji ukupne smjese, a ne samo za aktivni sastojak ili indikator (analiziranu tvar). Dodatne informacije o stvarnim koncentracijama mogu se pronaći u GD 39 (8).

Ispitivana kemikalija: distribucija veličine čestica

24. Distribuciju veličine čestica u aerosolu treba odrediti najmanje dvaput tijekom svakog izlaganja od četiri sata uporabom kaskadnog impaktora ili alternativnog instrumenta, poput uređaja za aerodinamičku analizu veličine čestica. Ako se može dokazati da su rezultati dobiveni kaskadnim impaktorom ili alternativnim instrumentom ekvivalentni, u cijelom se istraživanju može upotrebljavati alternativni instrument. Drugi uređaj, poput gravimetrijskog filtra ili uređaja za sudaranje/uređaja za mjerenje mjehurića plina, treba upotrijebiti paralelno s primarnim instrumentom kako bi se potvrdila učinkovitost skupljanja primarnog instrumenta. Koncentracija mase dobivena analizom veličine čestica trebala bi biti u razumnim granicama koncentracije mase dobivene analizom filtracijom [vidjeti GD 39 (8)]. Ako se ekvivalentnost može dokazati u ranoj fazi istraživanja, mogu se izostaviti daljnja mjerenja radi potvrde. Radi dobrobiti životinja treba provoditi mjerenja kako bi se na minimum sveli nepotpuni podaci koji mogu dovesti do potrebe za ponovnim izlaganjem. Određivanje veličine čestica treba provesti za pare ako postoji ikakva mogućnost da bi kondenzacijom pare mogao nastati aerosol ili ako čestice detektirane u atmosferi pare imaju potencijal za miješane faze (vidjeti stavak 14.).

POSTUPAK

Glavno ispitivanje

25. Za svaki se korak upotrebljavaju tri životinje svakog spola ili šest životinja osjetljivijeg spola. Ako izlaganju samo nosom nisu izloženi štakori nego druge vrste glodavaca, maksimalna trajanja izlaganja treba prilagoditi kako bi se na minimum sveo stres specifičan za vrstu. Visina koncentracije koju treba primijeniti kao početnu dozu odabrana je među četiri određene visine, a visina početne koncentracije treba biti ona za koju je najvjerojatnije da će izazvati toksičnost u nekima od doziranih životinja. Sheme ispitivanja za plinove, pare i aerosole (obuhvaćene dodacima 2. - 4.) predstavljaju ispitivanje s obustavljenim vrijednostima kategorija CLP 1 - 4 (9) za plinove (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (Dodatak 2.), za pare (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (Dodatak 3.) te za aerosole (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (Dodatak 4.). Kategorija 5, koja nije implementirana u Uredbu (EZ) br. 1272/2008 (9) odnosi se na koncentracije više od odgovarajućih graničnih koncentracija. Za svaku početnu koncentraciju primjenjuje se odgovarajuća shema ispitivanja. Ovisno o broju humano usmrćenih ili uginulih životinja, postupak ispitivanja slijedi naznačene strelice sve dok se ne omogući kategorizacija.

26. Vremensko razdoblje između izloženih skupina određuje se nastupom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Izlaganje životinja sljedećoj visini koncentracije treba odgoditi sve dok postoji opravdana mogućnost preživljavanja prethodno ispitivanih životinja. Preporučuje se razdoblje od tri ili četiri dana između izlaganja na svakoj visini koncentracije kako bi se omogućilo opažanje odgođene toksičnosti. Vremenski interval može se prilagoditi po potrebi, npr. u slučaju nepotpunih zaključaka.

▼M4

Granični test

27. Granični test primjenjuje se kada se za ispitivanu kemikaliju zna ili očekuje da je zapravo netoksična, npr. izvođenjem toksične reakcije samo iznad regulirajuće granične koncentracije. Informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije mogu se dobiti iz znanja o sličnim ispitivanim kemikalijama ili sličnim smjesama, uzimajući u obzir identitet i postotak poznatih komponenti za koje se zna da su od toksikološke važnosti. U takvim situacijama, u kojima postoji malo informacija o njezinoj toksičnosti ili ih uopće nema ili se za ispitivanu kemikaliju očekuje da bude toksična, treba provesti glavno ispitivanje [ostale upute nalaze se u GD 39. (8)].

28. Uz primjenu uobičajenog postupka tri životinje svakog spola ili šest životinja osjetljivijeg spola izložene su koncentracijama od 20 000 ppm za plinove, 20 mg/l za pare i 5 mg/l za prašinu/maglu redom (ako se može postići), što služi kao granični test za ovu ispitnu metodu. Kada se ispituje aerosol, primarni cilj treba biti postizanje veličine čestica koja se može udahnuti (MMAD 1 - 4 μm). To je s većinom ispitivanih kemikalija moguće na koncentraciji od 2 mg/l. Ispitivanje aerosola na koncentraciji višoj od 2 mg/l treba pokušati samo ako se može postići veličina čestica koja se može udisati [vidjeti GD 39. (8)]. Dodatno ispitivanje granične koncentracije destimulira se radi dobrobiti životinja u skladu s GHS (16). Ispitivanje u kategoriji 5 GHS (16), koje nije implementirano u Uredbi (EZ) br. 1272/2008 (9), treba uzeti u obzir samo ako postoji velika vjerojatno da će rezultati takvog ispitivanja biti izravno relevantni za zaštitu ljudskog zdravlja te u izvješću o studiji treba pružiti obrazloženje. U slučaju potencijalno eksplozivnih ispitivanih kemikalija treba voditi brigu o tome da se izbjegnu uvjeti povoljni za eksploziju. Kako bi se izbjegla nepotrebna primjena životinja, prije graničnog testa treba provesti ispitivanje bez životinja kako bi se osiguralo da se u komori mogu postići uvjeti za granični test.

OPAŽANJA

29. Životinje treba često klinički promatrati tijekom razdoblja izlaganja. Nakon izlaganje klinička promatranja treba obavljati najmanje dvaput na dan izlaganja ili češće ako to zahtijeva reakcija životinja na tretman te najmanje jedanput dnevno u sljedećih 14 dana. Duljina razdoblja promatranja nije fiksno određena, ali treba je odrediti u skladu s prirodom i vremenom nastupanja kliničkih znakova i duljinom razdoblja oporavka. Važni su trenuci u kojima se pojavljuju i nestaju znakovi toksičnosti, posebno ako postoji tendencija ka kašnjenju znakova toksičnosti. Sva se opažanja sustavno bilježe u pojedinačnoj evidenciji za svaku životinju. Životinje u stanju ugibanja te životinje koje pokazuju znakove jake patnje i/ili trajne znakove ozbiljnog stresa treba humano usmrtiti radi njihove dobrobiti. Pri provođenju ispitivanja radi otkrivanja kliničkih znakova toksičnosti treba paziti na to da se početno slabo pojavljivanje i prolazne promjene u disanju koje su rezultat postupka izlaganja ne zamijene učincima povezanim s tretmanom. U obzir treba uzeti načela i kriterije rezimirane u Smjernici o humanom usmrćivanju (GD 19.) (7). Ako se životinje usmrte zbog humanih razloga ili ih se pronađe uginule, vrijeme ugibanja treba zabilježiti što je moguće preciznije.

▼M4

30. Promatranja u kavezu moraju uključivati promjene na koži i krznu, očima i sluznicama te dišnom, cirkulacijskom, autonomnom i središnjem živčanom sustavu te somatomotoričkoj aktivnosti i uzorcima ponašanja. Ako je moguće, treba zamijetiti razliku između lokalnih i sistemskih učinaka. Treba obratiti pozornost na opažanje tremora, konvulzija, salivacije, dijareje, letargije, spavanja i kome. Mjerenje rektalne temperature može pružiti dodatne dokaze o refleksnoj bradipneji ili hipo/hipertermiji povezanoj s tretiranjem ili držanjem u zatvorenom.

Tjelesna masa

31. Pojedinačnu masu životinja treba zabilježiti jedanput tijekom razdoblja aklimatizacije, na dan izlaganja prije samog izlaganja (0. dan), barem 1., 3. i 7. dana (i jedanput tjedno nakon toga) te u trenutku ugibanja ili usmrćenja ako nastupe iza 1. dana. Tjelesna masa prepoznaje se kao kritični pokazatelj toksičnosti pa treba pobliže pratiti životinje u kojih je primijećen neprekidan pad od ≥ 20 % u usporedbi s vrijednostima prije istraživanja. Životinje koje prežive važu se i humano usmrćuju na kraju razdoblja nakon izlaganja.

Patologija

32. Sve pokusne životinje, uključujući i one koje su tijekom ispitivanja uginule ili usmrćene i uklonjene iz istraživanja radi svoje dobrobiti, treba podvrgnuti makroskopskoj obdukciji. Ako se obdukcija ne može provesti neposredno nakon otkrića uginule životinje, životinju treba ohladiti (ne zamrznuti) na dovoljno niskim temperaturama kako bi se na minimum svela razgradnja. Obdukciju treba provesti što je moguće prije, obično u roku od jednog ili dva dana. Za svaku životinju treba zabilježiti sve makroskopske patološke promjene uz poseban naglasak na promjenama u respiratornom traktu.

33. Dodatne pretrage, *a priori* obuhvaćene planom ispitivanja, mogu se razmotriti radi proširenja interpretacijske vrijednosti istraživanja poput mjerenja mase pluća preživjelih štakora i/ili pružanja dokaza iritacije pomoću mikroskopske pretrage respiratornog trakta. Ispitani organi također mogu obuhvaćati organe koji pružaju dokaze o makroskopskoj patologiji u životinja koje su preživjele 24 sata ili dulje te organa za koje se zna ili očekuje da su pogođeni. Mikroskopska pretraga cijelog respiratornog trakta može pružiti korisne informacije za ispitivane kemikalije koje reagiraju s vodom, poput kiselina i higroskopskih ispitivanih kemikalija.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

34. Treba pribaviti pojedinačne podatke o tjelesnoj masi i nalazima obdukcije za svaku životinju. Podatke prikupljene kliničkim promatranjem treba sažeti u obliku tablice, koja za svaku ispitnu skupinu pokazuje broj upotrijebljenih životinja, broj životinja koje pokazuju specifične znakove toksičnosti, broj životinja koje su tijekom ispitivanja pronađene uginule ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme uginuća svake životinje, opis i vremenski tijek te reverzibilnost toksičnih učinaka i nalaze obdukcije.

▼M4

Izvješće o ispitivanju

35. Izvješće o ispitivanju treba, ako je primjereno, sadržavati sljedeće informacije:

Pokusne životinje i njihov uzgoj

— opis uvjeta u kavezu, uključujući: broj (ili promjenu broja) životinja u svakom kavezu, materijal podloge, temperaturu i relativnu vlažnost zraka u kavezu, razdoblje svjetla i tame, identifikaciju prehrane,

— korištenu vrstu/soj i obrazloženje za uporabu druge vrste osim štakora,

— broj, dob i spol životinja,

— metodu nasumičnog odabira,

— detalje o kvaliteti hrane i vode (uključujući i vrstu/podrijetlo prehrane, izvor vode),

— opis kondicioniranja prije ispitivanja, uključujući i prehranu, karantenu i liječenje bolesti,

Ispitivana kemikalija

— Fizikalna narav, čistoća te, ako je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (uključujući izomerizaciju),

— Identifikacijski podaci i broj registracije Chemical Abstract Services (CAS), ako je poznat,

Nosač

— Obrazloženje za uporabu nosača i obrazloženje za odabir nosača (ako nije voda),

— Povijesni ili odgovarajući podaci koji pokazuju da nosač ne ometa rezultate istraživanja,

Komora za inhalaciju

— Opis komore za inhalaciju, uključujući i dimenzije i volumen,

— Podrijetlo i opis opreme korištene za izlaganje životinja te stvaranje atmosfere,

— Oprema za mjerenje temperature, vlažnosti, veličine čestica te stvarne koncentracije,

— Izvor zraka i obrada dovoda/odvoda zraka i sustav korišten za kondicioniranje,

— Metode korištene za kalibriranje opreme radi osiguravanja homogene atmosfere za ispitivanje,

— Razlika u tlaku (pozitivna ili negativna),

— Otvori za izlaganje po komori (samo nos), lokacija životinja u sustavu (čitavo tijelo),

— Privremena homogenost/stabilnost atmosfere za ispitivanje,

— Lokacija senzora temperature i vlažnosti te uzorkovanje ispitne atmosfere u komori,

— Brzine protoka zraka, otvor za brzinu protoka zraka po izlaganju (samo nos) ili dovod životinja po komori (čitavo tijelo),

— Informacije o opremi upotrijebljenoj za mjerenje kisika i ugljikova dioksida, ako je primjenjivo,

▼M4

— Vrijeme potrebno za postizanje uravnoteženja u komori za inhalaciju (t_{95}),

— Broj promjena u volumenu po satu,

— Uređaji za mjerenje (ako je primjenjivo),

Podaci o izlaganju

— Argumentacija za odabir ciljane koncentracije u glavnom istraživanju,

— Nazivne koncentracije (ukupna masa ispitivane kemikalije proizvedena u komori za inhalaciju podijeljena s volumenom zraka koji je prošao kroz komoru),

— Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije iz zone udisanja životinja; za ispitne smjese koje stvaraju heterogene fizikalne oblike (plinove, pare, aerosol) svaka se može analizirati odvojeno,

— Sve koncentracije zraka moraju se prikazati u jedinicama za masu (npr. mg/l, mg/m^3 itd.); jedinice za volumen (npr. ppm, ppb itd.) također se mogu prikazati usput,

— Distribucija veličine čestica, srednji aerodinamički promjer čestica (MMAD) te geometrijska standardna devijacija (σ_g) uključujući metode za njihov izračun. Treba prijaviti pojedinačne analize veličine čestica,

Uvjeti ispitivanja

— Detalji o pripremi ispitivane kemikalije, uključujući i detalje o svim postupcima korištenima za smanjenje veličine čestica krutih materijala ili za pripremu otopina ispitivane kemikalije. U slučajevima u kojima su mehanički postupci mogli izmijeniti sastav ispitivane kemikalije uključiti rezultat analiza za utvrđivanje sastava ispitivane tvari,

— Opis (po mogućnosti uz dijagram) opreme korištene za stvaranje atmosfere za ispitivanje te izlaganje životinja atmosferi za ispitivanje,

— Detalji korištene kemijske analitičke metode i potvrda metode (uključujući učinkovitost rekuperacije ispitivane kemikalije iz medija za uzorkovanje),

— Argumentacija za odabir ispitnih koncentracija,

Rezultati

— Tablični prikaz temperature, vlažnosti zraka i protoka zraka u komori,

— Tablični prikaz podataka o nazivnoj i stvarnoj koncentraciji u komori,

— Tablični prikaz podataka o veličini čestica, uključujući i podatke o skupljenim analitičkim uzorcima, distribuciju veličina čestica te izračune MMAD i σ_g,

— Tablični prikaz podataka o reakciji i razini koncentracije za svaku životinju (npr. životinje koje pokazuju znakove toksičnosti uključujući smrtnost, prirodu, ozbiljnost i trajanje učinaka),

— Individualne tjelesne mase životinja prikupljene tijekom istraživanja; datum i vrijeme uginuća ako je nastupilo prije programiranog usmrćenja; vremenski tijek nastupanja znakova toksičnosti te jesu li bili reverzibilni za svaku životinju,

▼M4

— Nalazi obdukcije i histopatološki nalazi za svaku životinju ako su dostupni,

— Razvrstavanje u kategorije CLP i obustavljena vrijednost LC_{50},

Rasprava i tumačenje rezultata

— Poseban naglasak treba staviti na opis metoda korištenih za ispunjavanje kriterija ove ispitne metode, npr. graničnu koncentraciju ili veličinu čestica,

— Treba se pozabaviti sposobnošću udisanja čestica u svjetlu općih nalaza, posebno ako se nisu mogli ispuniti kriteriji za veličinu čestica,

— U opću ocjenu istraživanja treba uključiti dosljednost metoda korištenih za određivanje nazivnih i stvarnih koncentracija te odnos stvarne koncentracije prema nazivnoj,

— Treba se pozabaviti vjerojatnim uzrokom smrti i prevladavajućim načinom djelovanja (sistemski u odnosu na lokalni).

— U slučaju humanog usmrćivanja životinja koje su patile ili pokazivale znakove velikog i trajnog stresa treba pružiti objašnjenje na temelju kriterija iz Smjernice za humano usmrćivanje OECD-a (7).

LITERATURA

1. Poglavlje B.2 ovog Priloga, Akutna toksičnost (inhalacijska).

2. Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

3. Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

4. Diener W, Kayser D and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

5. Poglavlje B.1 tris ovog Priloga, Akutna oralna toksičnost - metoda utvrđivanja akutnog toksičnog razreda.

6. OECD (2009.). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OECD (2000.). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2009.). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. za razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, kojom se izmjenjuju i dopunjuju i ukidaju direktive 67/548/EEZ i 1999/45/EZ te izmjenjuje i dopunjuje Uredba (EZ) br. 1907/2006, SL L 353, 31.12.2008., str. 1.

▼**M4**

10. Poglavlje B.40 ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test transkutanog električnog otpora (TER).

11. Poglavlje B.40 bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: test na modelu ljudske kože.

12. OECD (2005.). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

15. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

16. UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Dostupno: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJA

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M4

Dodatak 2.

Postupak koji treba slijediti za svaku početnu koncentraciju za plinove (ppm/4 h)

Opće napomene ([1])

Za svaku početnu koncentraciju odgovarajuće sheme ispitivanja, kao što je obuhvaćeno ovim Dodatkom, izlažu postupak koji treba slijediti.

Dodatak 2.a: Početna koncentracija iznosi 100 ppm

Dodatak 2.b: Početna koncentracija iznosi 500 ppm

Dodatak 2.c: Početna koncentracija iznosi 2 500 ppm

Dodatak 2.d: Početna koncentracija iznosi 20 000 ppm

Ovisno o broju humano usmrćenih ili uginulih životinja postupak ispitivanja slijedi naznačene strelice.

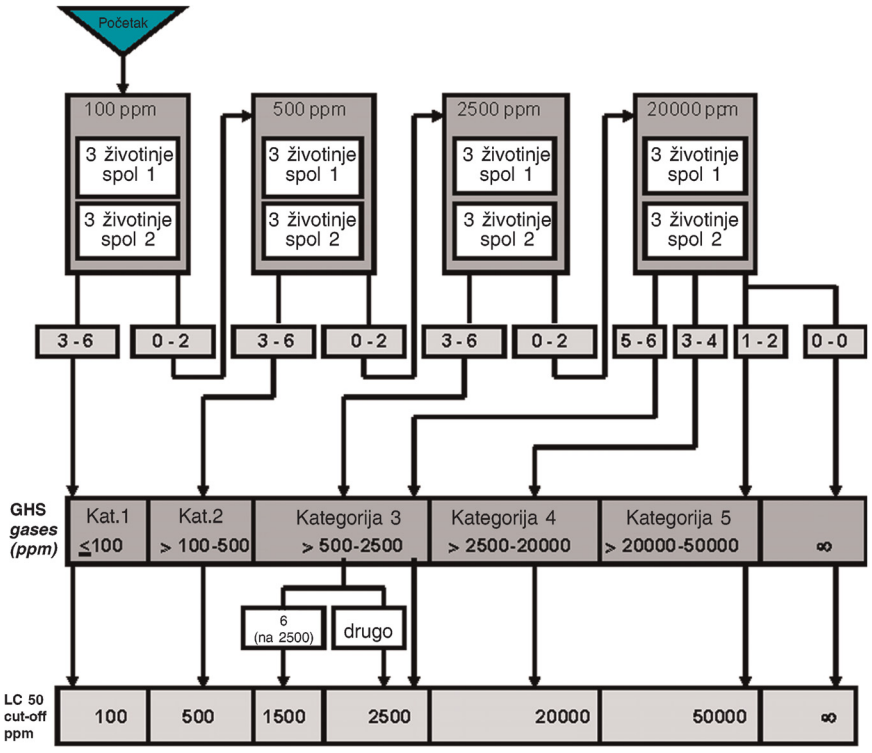
([1]) Sljedeće se tablice odnose na GHS (Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje i označivanje kemikalija). EU ekvivalent je Uredba (EZ) br. 1272/2008. U slučaju akutne inhalacijske toksičnosti Uredba (EZ) br. 1272/2008 (9) ne implementira kategoriju 5.

▼M4

Dodatak 2.a

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 100 ppm/4 h za plinove



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

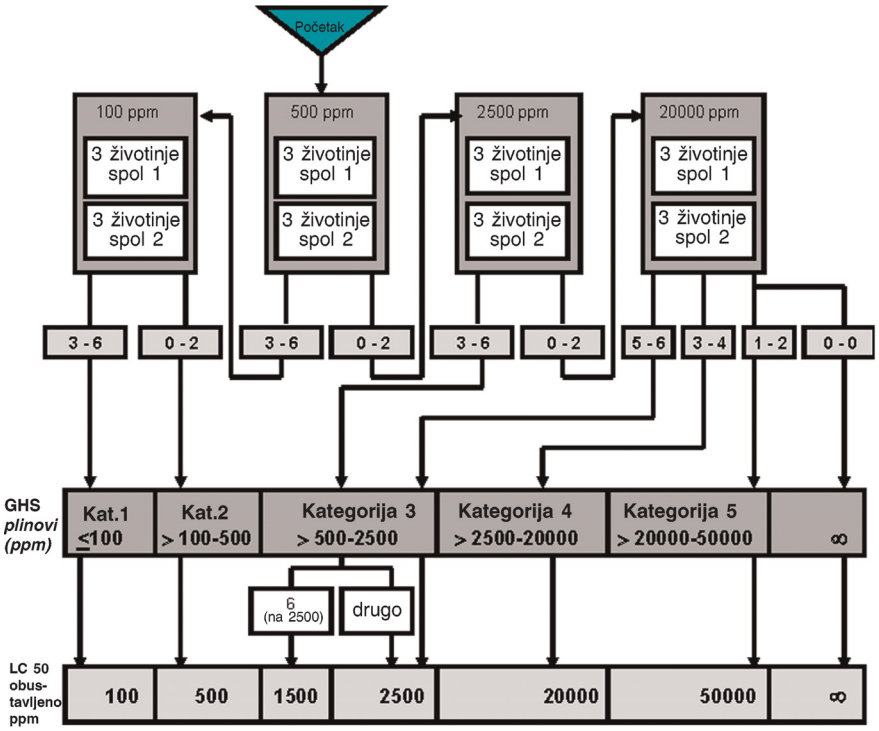
— ispitivanje na ≥ 20000 ppm/4 h: vidjeti Smjernicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 2.b

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 500 ppm/4 h za plinove



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

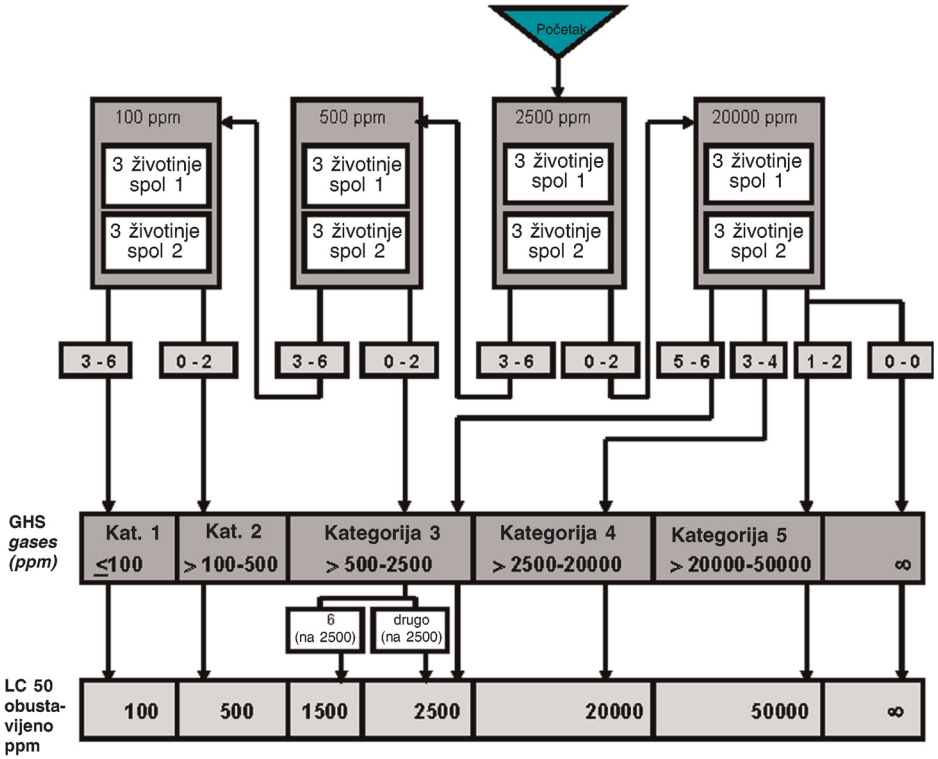
— ispitivanje na ≥ 20000 ppm/4 h: vidjeti Smjernicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 2.c

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 2 500 ppm/4 h za plinove



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0–6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

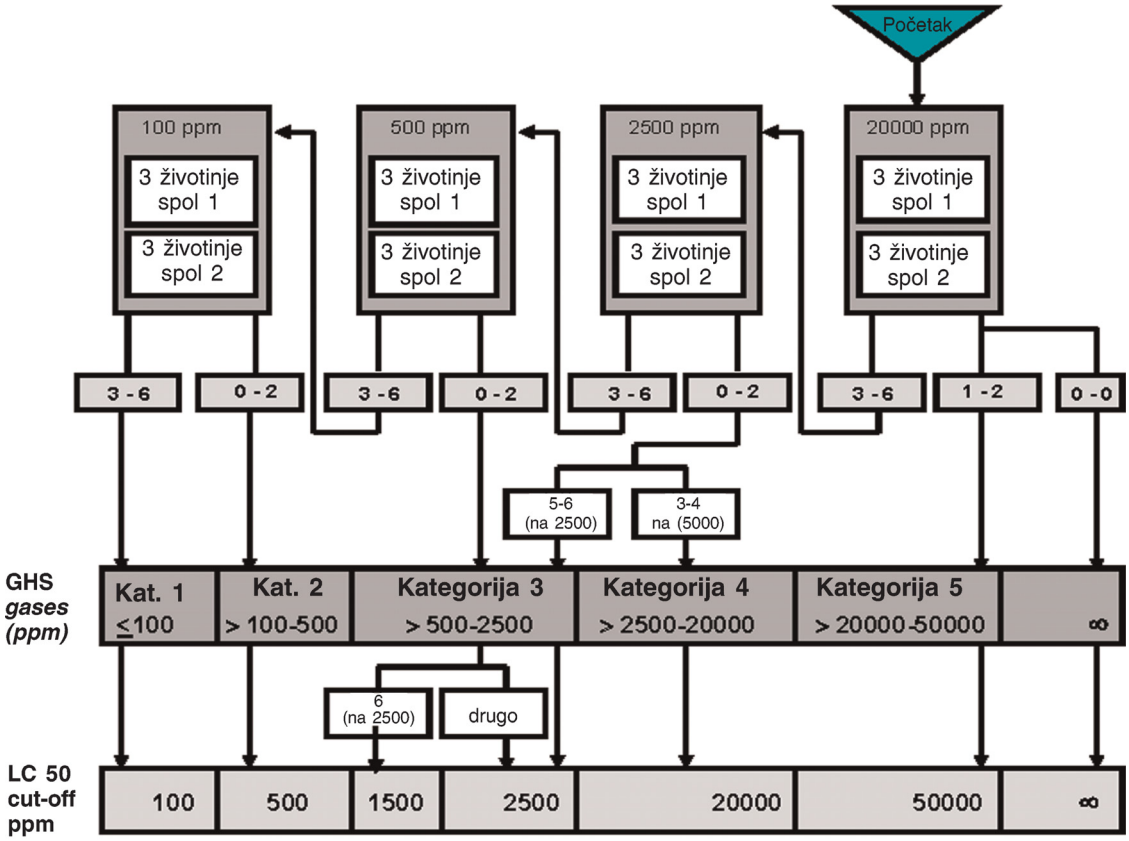
— ispitivanje na ≥ 20000 ppm/4 h: vidjeti Smjernicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 2.d

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 20 000 ppm/4 h za plinove



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

— ispitivanje na ≥ 20000 ppm/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼**M4**

Dodatak 3.

Postupak koji treba slijediti za svaku početnu koncentraciju za pare (mg/l/4 h)

Opće napomene ([1])

Za svaku početnu koncentraciju odgovarajuće sheme ispitivanja, kao što je obuhvaćeno ovim Dodatkom, izlažu postupak koji treba slijediti.

Dodatak 3.a: Početna koncentracija iznosi 0,5 mg/l

Dodatak 3.b: Početna koncentracija iznosi 2,0 mg/l

Dodatak 3.c: Početna koncentracija iznosi 10 mg/l

Dodatak 3.d: Početna koncentracija iznosi 20 mg/l

Ovisno o broju humano usmrćenih ili uginulih životinja, postupak ispitivanja slijedi naznačene strelice.

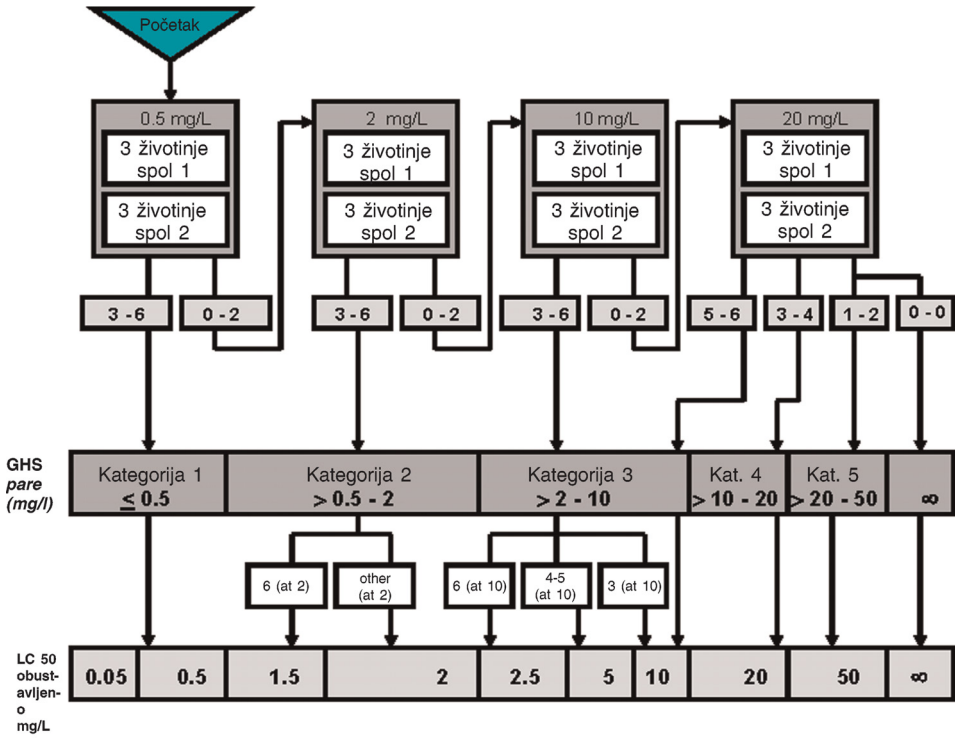
([1]) Sljedeće se tablice odnose na GHS (Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje i označivanje kemikalija). EU ekvivalent je Uredba (EZ) br. 1272/2008. U slučaju akutne inhalacijske toksičnosti Uredba (EZ) br. 1272/2008 (9) ne implementira kategoriju 5.

▼M4

Dodatak 3.a

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 0,5 mg/L/4h za pare



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0-6: broj umiručih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

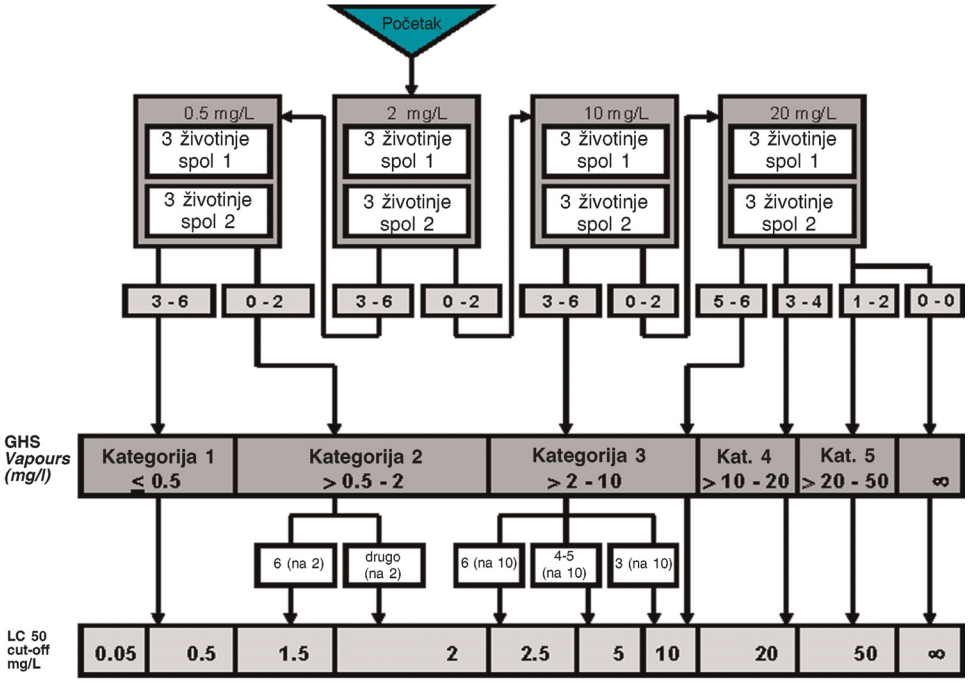
— ispitivanje na50 mg/L/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 3.b

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 2 mg/L/4 h za pare



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0–6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

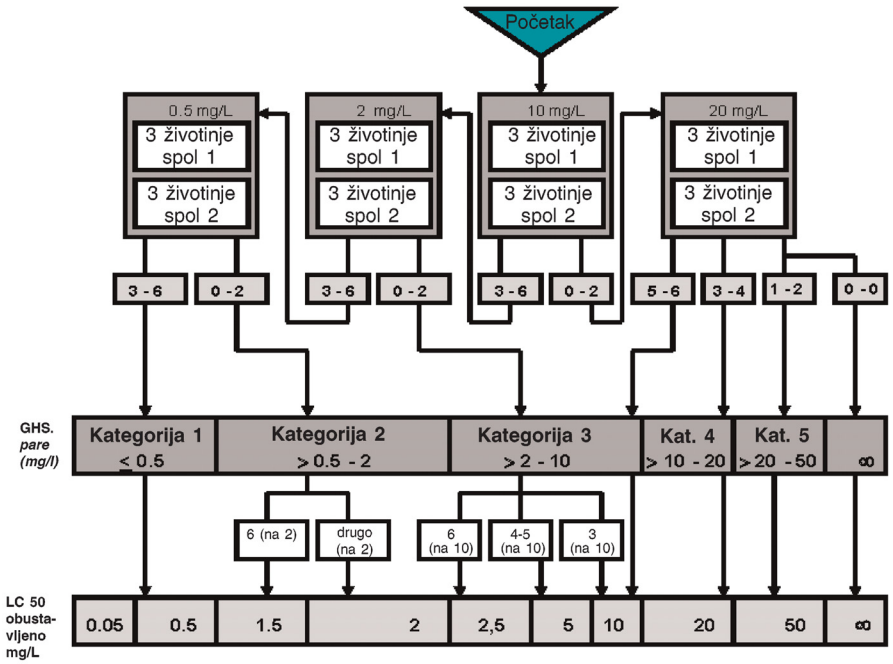
— ispitivanje na50 mg/L/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 3.c

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 10 mg/L/4 h za pare



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0–6: broj umiručih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

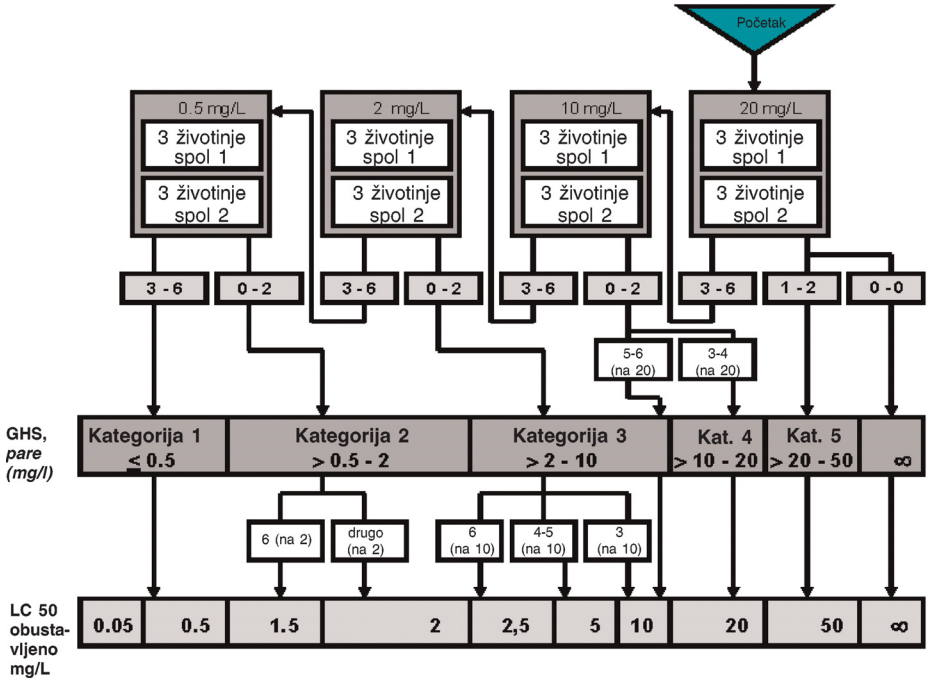
— ispitivanje na50 mg/L/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 3.d

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 20 mg/L/4 h za pare



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku

— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji

— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje

— ∞: nerazvrstano

— ispitivanje na 50 mg/L/4 h: vidjeti Smjernicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 4.

Postupak koji treba slijediti za svaku početnu koncentraciju za aerosole (mg/l/4 h)

Opće napomene ([1])

Za svaku početnu koncentraciju odgovarajuće sheme ispitivanja, kao što je obuhvaćeno ovim Dodatkom, izlažu postupak koji treba slijediti.

Dodatak 4.a: Početna koncentracija iznosi 0,05 mg/l

Dodatak 4.b: Početna koncentracija iznosi 0,5 mg/l

Dodatak 4.c: Početna koncentracija iznosi 1 mg/l

Dodatak 4.d: Početna koncentracija iznosi 5 mg/l

Ovisno o broju humano usmrćenih ili uginulih životinja, postupak ispitivanja slijedi naznačene strelice.

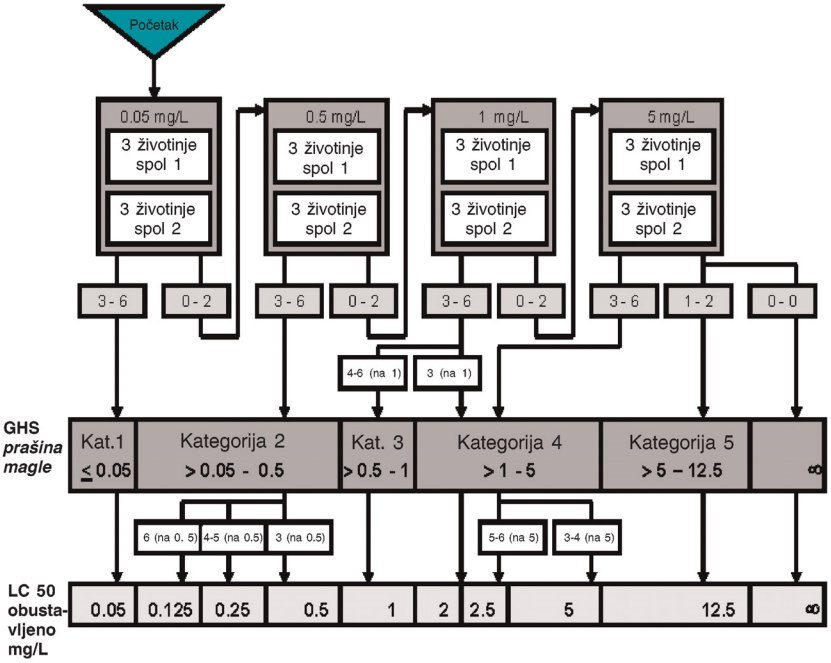
([1]) Sljedeće se tablice odnose na GHS (Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje i označivanje kemikalija). EU ekvivalent je Uredba (EZ) br. 1272/2008. U slučaju akutne inhalacijske toksičnosti Uredba (EZ) br. 1272/2008 (9) ne implementira kategoriju 5.

▼M4

Dodatak 4.a

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 0,05 mg/L/4 h za pare



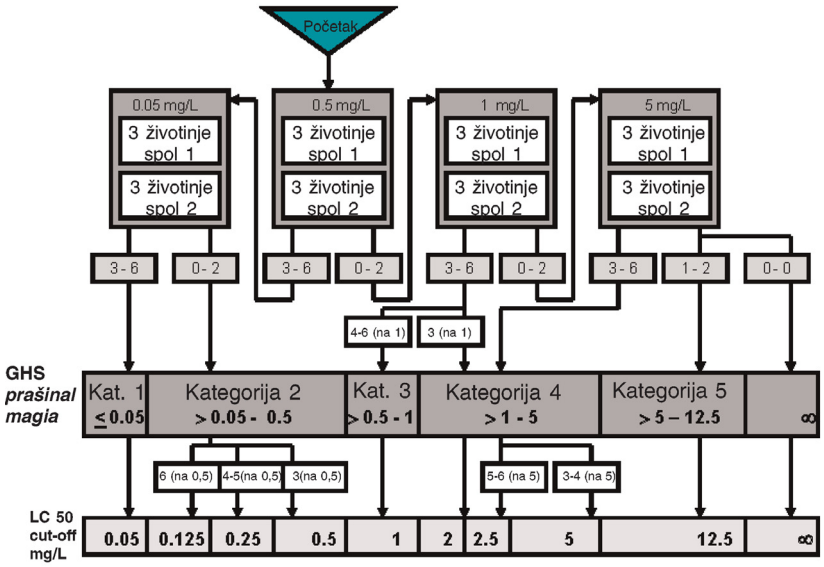
— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku
— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji
— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje
— ∞: nerazvrstano
— ispitivanje na 12,5 mg/L/4 h: vidjetii Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 4.b

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 0,5 mg/L/4 h za aerosole



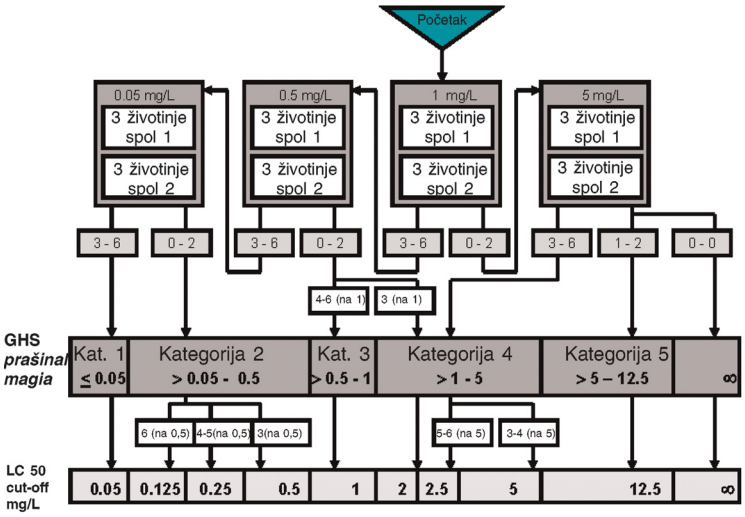
— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku
— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji
— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje
— ∞: nerazvrstano
— ispitivanje na 12,5 mg/L/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 4.c

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 1 mg/L/4 h za aerosole



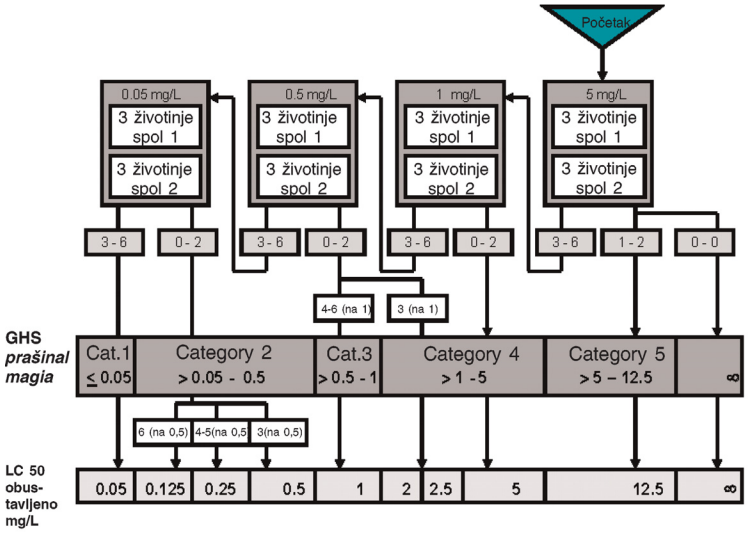
— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku
— 0-6: broj umirućih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji
— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje
— ∞: nerazvrstano
— ispitivanje na 12,5 mg/L/4 h: vidjeti Smjemicu 39. (8)

▼M4

Dodatak 4.d

Akutna inhalacijska toksičnost

Postupak ispitivanja s početnom koncentracijom od 5 mg/L/4 h za aerosole.



— Koristi se 3 ♂ + 3 ♀, ili 6 životinja osjetljivijeg spola po koraku
— 0-6: broj umiručih ili mrtvih životinja po ispitivanoj koncentraciji
— GHS: Globalno usklađeni sustav za razvrstavanje
— ∞: nerazvrstano
— ispitivanje na 12,5 mg/L/4 h: vidjeti Smjernicu 39. (8)”

▼M5

B.53. STUDIJA RAZVOJNE NEUROTOKSIČNOSTI

UVOD

1. Ova ispitna metoda istovjetna je Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 426 (2007). U lipnju 1995. radna skupina OECD-a za reproduktivnu i razvojnu toksičnost raspravljala je u Kopenhagenu o potrebi za ažuriranjem postojećih smjernica OECD-a za ispitivanje reproduktivne i razvojne toksičnosti te razvojem novih smjernica za krajnje točke koje još nisu obuhvaćene (1). Radna skupina preporučila je da se smjernica za ispitivanje razvojne neurotoksičnosti sastavi na temelju smjernice Agencije za zaštitu okoliša SAD-a (USEPA) koja je od tada revidirana (2). U lipnju 1996. u Kopenhagenu je održano drugo savjetovanje na kojem je tajništvo obaviješteno o nacrtu nove smjernice za ispitivanje razvojne neurotoksičnosti, uključujući glavne elemente poput, primjerice, pojedinosti o odabiru životinjskih vrsta, razdoblja doziranja, razdoblja ispitivanja, krajnjih točaka koje treba procijeniti i kriterija za vrednovanje rezultata. Američka smjernica za procjenu rizika od neurotoksičnosti objavljena je 1998. (3). U listopadu 2000. održani su, jedno za drugim, stručno savjetovanje OECD-a i radionica Instituta za znanost o riziku Međunarodnog instituta za znanost o životu (ILSI), a 2005. u Tokiju je održano stručno savjetovanje. Ti su sastanci održani kako bi se raspravljalo o znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanima s postojećom smjernicom za ispitivanje te su kod razvoja ove ispitne metode razmotrene preporuke s tih sastanaka (4) (5) (6) (7). Dodatne informacije o provedbi, tumačenju i terminologiji upotrijebljenoj za ovu ispitnu metodu nalaze se u Smjernicama OECD-a br. 43„Ispitivanje i procjena reproduktivne toksičnosti” (8) i br. 20„Ispitivanje neurotoksičnosti” (9).

UVODNA RAZMATRANJA

2. Poznato je da brojne kemikalije imaju učinke razvojne neurotoksičnosti u ljudi i drugih vrsta (10) (11) (12) (13). Za procjenu i vrednovanje toksičnih svojstava određene kemikalije može biti potrebno utvrđivanje potencijala razvojne neurotoksičnosti. Studije razvojne neurotoksičnosti namijenjene su osiguravanju podataka, uključujući karakterizacije doza-reakcija, o mogućim funkcionalnim i morfološkim učincima na živčani sustav potomaka u razvoju koji mogu nastati zbog izloženosti u maternici i u ranoj fazi života.

3. Studija razvojne neurotoksičnosti može se provesti kao zasebna studija, kao dio studije reproduktivne toksičnosti i/ili neurotoksičnosti u odrasloj dobi (primjerice, ispitne metode B.34. (14), B.35. (15), B.43. (16)) ili kao dodatak studiji prenatalne razvojne toksičnosti (primjerice, ispitna metoda B.31. (17)). Ako je studija razvojne neurotoksičnosti dio druge studije ili njezin dodatak, ključno je očuvati cjelovitost obiju vrsta studija. Sva bi ispitivanja trebala biti u skladu s primjenjivim zakonodavstvom ili državnim i institucionalnim smjernicama za upotrebu laboratorijskih životinja u istraživanju (primjerice, 18).

4. Prije početka studije ispitni laboratorij trebao bi razmotriti sve dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji. Takve će informacije uključivati identitet i kemijsku strukturu kemikalije, njezina fizikalno-kemijska svojstva, rezultate svih ostalih ispitivanja toksičnosti kemikalije in vitro ili in vivo, toksikološke podatke o strukturno povezanim kemikalijama te planiranu upotrebu (planirane upotrebe) kemikalije. Te su informacije nužne kako bi se svim zainteresiranim stranama dokazalo da je ispitivanje bitno za zaštitu zdravlja ljudi te će pomoći u odabiru odgovarajuće početne doze.

▼M5

NAČELO ISPITNE METODE

5. Ispitivana kemikalija daje se životinjama tijekom gestacije i laktacije. Ženke se ispituju radi procjene učinaka u ženki koje su skotne i koje doje te radi mogućih usporednih informacija (ženke u usporedbi s potomcima). Potomci se nasumično biraju iz legala radi vrednovanja neurotoksičnosti. Vrednovanje se sastoji od opažanja radi otkrivanja velikih neuroloških abnormalnosti i abnormalnosti u ponašanju, uključujući procjenu fizičkog razvoja, bihevioralnu ontogenezu, motoričku aktivnost, motoričke i osjetilne funkcije te učenje i pamćenje te vrednovanja težine mozga i neuropatologije tijekom postnatalnog razvoja i u odrasloj dobi.

6. Ako se ispitna metoda provodi kao zasebna studija, dodatne dostupne životinje u svakoj skupini mogle bi se upotrebljavati za posebne neurobihevioralne, neuropatološke, neurokemijske ili elektrofiziološke postupke kojima se mogu dopuniti podaci dobiveni pregledima koji se preporučuju ovom ispitnom metodom (16) (19) (20) (21). Dopunski postupci mogu biti osobito korisni kada empirijsko opažanje, očekivani učinci ili mehanizam/način funkcioniranja ukazuju na posebnu vrstu neurotoksičnosti. Ti dopunski postupci mogu se upotrebljavati u ženki i u mladunaca. Osim toga, mogu se upotrebljavati i postupci ex vivo ili in vitro sve dok ne utječu na cjelovitost postupaka in vivo.

PRIPREME ZA ISPITIVANJE

Odabir životinjskih vrsta

7. Štakor je poželjna ispitna vrsta. Ostale se vrste mogu upotrebljavati prema potrebi. Međutim, treba uzeti u obzir da su gestacijski i postnatalni dani navedeni u ovoj ispitnoj metodi specifični za često upotrebljavane sojeve štakora te bi u slučaju upotrebe drugih vrsta ili neuobičajenog soja trebalo odabrati usporedive dane. Upotrebu druge vrste trebalo bi obrazložiti na temelju toksikoloških, farmakokinetičkih i/ili ostalih podataka. U obrazloženju bi trebalo navesti dostupnost postnatalnih neurobihevioralnih i neuropatoloških procjena specifičnih za vrstu. Ako postoji prethodno ispitivanje koje je izazvalo zabrinutost, trebalo bi razmotriti vrstu/soj koji su izazvali zabrinutost. Zbog različitih atributa učinka različitih sojeva štakora trebali bi postojati dokazi da soj koji je odabran za upotrebu ima odgovarajuću plodnost i reakciju. Trebalo bi dokumentirati pouzdanost i osjetljivost ostalih vrsta kod utvrđivanja razvojne neurotoksičnosti.

Uvjeti smještaja i hranjenja

8. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 ± 3 °C. Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Svjetlost bi trebala biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Prije parenja i tijekom trajanja studije moguće je i obrnuti ciklus svjetlosti kako bi se procijenile funkcionalne i bihevioralne krajnje točke tijekom razdoblja tame (pod crvenim svjetlom), odnosno tijekom razdoblja uobičajene aktivnosti životinja (22). Sve promjene ciklusa svjetlo-tama trebale bi uključivati odgovarajuće razdoblje prilagodbe kako bi se životinje prilagodile na novi ciklus. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće. Trebalo bi navesti vrstu hrane i vode te bi ih trebalo analizirati s obzirom na kontaminate.

▼M5

9. Životinje se mogu smjestiti odvojeno ili držati u kavezima u malim skupinama istog spola. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Nakon što je očito da je došlo do kopulacije ili najkasnije na 15. dan graviditeta životinje koje su se parile treba smjestiti u posebne kaveze za okot ili materinstvo. Kaveze treba urediti tako da se eventualni učinci držanja u kavezu svedu na minimum. Pred termin partucije skotnim ženkama treba osigurati odgovarajući i utvrđeni materijal za pravljenje gnijezda. Poznato je da neodgovarajuće rukovanje ili stres tijekom graviditeta može imati nepovoljne ishode, uključujući prenatalni gubitak i izmijenjeni fetalni i postnatalni razvoj. Radi zaštite od fetalnoga gubitka zbog faktora nevezanih uz tretiranje, tijekom graviditeta životinjama treba pažljivo rukovati te treba izbjegavati stres izazvan vanjskim faktorima kao što je prekomjerna buka.

Priprema životinja

10. Treba upotrebljavati zdrave životinje koje su se prilagodile laboratorijskim uvjetima i koje ranije nisu bile podvrgavane eksperimentalnim postupcima, osim ako je studija dio druge studije (vidjeti stavak 3.). Ispitne životinje treba okarakterizirati u pogledu vrste, soja, spola, mase i starosti. Svakoj životinji treba dodijeliti jedinstveni identifikacijski broj i označiti je njime. Životinje u svim ispitnim skupinama trebale bi u najvećoj mogućoj mjeri biti ujednačene mase i starosti te unutar uobičajenog raspona vrste i soja koji se ispituju. Za svaku visinu doze treba upotrebljavati mlade odrasle ženke koje još nisu imale potomstvo. Potrebno je osigurati izbjegavanje parenja između braće i sestara. Nulti dan gestacije dan je kad se opazi vaginalni čep i/ili sperma. Nakon nabave već gravidnih životinja od dobavljača treba predvidjeti odgovarajuće razdoblje prilagodbe (primjerice 2 do 3 dana). Parene ženke treba nasumično i u najvećoj mogućoj mjeri ravnomjerno rasporediti u kontrole skupine i skupine za tretiranje (npr., preporučuje se stratificirani nasumični postupak kako bi se osigurao ravnomjeran raspored u svim skupinama poput postupka na temelju tjelesne mase). Ženke koje je oplodio isti mužjak treba ujednačeno rasporediti po skupinama.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

11. Svaka ispitna i kontrolna skupina treba sadržavati dovoljan broj skotnih ženki koje treba izložiti ispitivanoj kemikaliji kako bi se osiguralo da se okoti odgovarajući broj potomaka za vrednovanje neurotoksičnosti. Za svaku visinu doze preporučuje se ukupno 20 legala. Dopušteni su ponovljeni i postupni planovi doziranja skupinama ako se postigne ukupan broj legala po skupini te ako se u obrazloženju ponavljanja upotrebljavaju odgovarajući statistički modeli.

12. Na 4. postnatalni dan (PND) ili prije njega (dan okota je nulti postnatalni dan) veličina svakog legla trebala bi se prilagoditi uklanjanjem dodatnih mladunaca slučajnim odabirom kako bi se postigla ista veličina svih legala (23). Veličina legla ne bi trebala premašivati prosječnu veličinu legla za upotrijebljeni soj glodavaca (8–12). Leglo bi po mogućnosti, trebalo imati jednak broj muških i ženskih mladunaca. Selektivno uklanjanje mladunaca, primjerice prema tjelesnoj masi, nije prihvatljivo. Nakon standardizacije legala (izdvajanje) i prije daljnjeg ispitivanja funkcionalnih krajnjih točaka pojedinačne mladunce koji su određeni za ispitivanje prije ili nakon odbijanja od sise trebalo bi jedinstveno identificirati s pomoću neke odgovarajuće humane metode identifikacije mladunaca (primjerice 24).

▼M5

Raspodjela životinja za funkcionalna i bihevioralna ispitivanja, vrednovanje težine mozga i neuropatološko vrednovanje

13. Ispitnom metodom omogućeni su različiti pristupi u pogledu raspodjele životinja izloženih in utero i laktacijom za funkcionalna i bihevioralna ispitivanja, spolno sazrijevanje, utvrđivanje težine mozga i neuropatološko vrednovanje (25). Ostala ispitivanja neurobihevioralne funkcije (npr. društveno ponašanje), neurokemije ili neuropatologije mogu se dodavati u pojedinačnim slučajevima sve dok nije narušena cjelovitost izvornih nužnih ispitivanja.

14. Mladunci se biraju iz svake skupine koja je primila određenu dozu te se raspoređuju za procjene krajnjih točaka na 4. postnatalni dan ili nakon njega. Mladunce po mogućnosti, treba birati tako da su oba spola iz svakog legla u svakoj skupini koja prima određenu dozu jednako zastupljena u svim ispitivanjima. Kod ispitivanja motoričke aktivnosti isti par muških i ženskih mladunaca treba ispitivati u svim dobima prije odbijanja od sise (vidjeti stavak 35.). Pri svim ostalim ispitivanjima isti ili zasebni parovi muških i ženskih životinja mogu se rasporediti za različita bihevioralna ispitivanja. Različite mladunce će možda trebati rasporediti za ispitivanja kognitivne funkcije u životinja koje se odbijaju od sise i odraslih životinja kako bi se izbjeglo miješanje učinaka dobi i ranijeg treninga na te vrijednosti (26) (27). Nakon odbijanja od sise (21. postnatalni dan) mladunci koji nisu odabrani za ispitivanje mogu se humano usmrtiti. Treba zabilježiti sve promjene u raspodjeli mladunaca. Statistička mjerna jedinica trebala bi biti leglo (ili ženka), a ne mladunac.

15. Postoje različiti načini raspodjele mladunaca za preglede prije i nakon odbijanja od sise, kognitivna ispitivanja, patološke preglede itd. (vidjeti sliku 1. za opći plan i Dodatak 1. za primjere raspodjele). Preporučen je minimalan broj životinja u svakoj skupini koja prima određenu dozu za preglede prije i nakon odbijanja od sise kako slijedi:

Klinička opažanja i tjelesna masa	Sve životinje
Detaljna klinička opažanja	20/spol (1/spol/leglo)
Težina mozga (nakon fiksacije) 11–22. PND	10/spol (1/leglo)
Težina mozga (nefiksiranog) ~ 70. PDN	10/spol (1/leglo)
Neuropatologija (uranjanje ili perfuzijska fiksacija) 11–22. PND	10/spol (1/leglo)
Neuropatologija (perfuzijska fiksacija) 70. PND	10/spol (1/leglo)
Spolno sazrijevanje	20/spol (1/spol/leglo)
Ostale razvojne posebnosti (opcija)	Sve životinje
Bihevioralna ontogeneza	20/spol (1/spol/leglo)
Motorička aktivnost	20/spol (1/spol/leglo)
Motorička i osjetilna funkcija	20/spol (1/spol/leglo)
Učenje i pamćenje	10/spol ([a]) (1/leglo)

([a]) Trebalo bi razmotriti ispitivanje znatno većeg broja životinja ovisno o osjetljivosti ispitivanja kognitivne funkcije, npr. do 1 mužjaka i 1 ženke po leglu (za raspodjelu životinja vidjeti Dodatak 1.) (daljnje smjernice o veličini uzorka navedene su u Smjernici OECD-a 43 (8)).

▼M5

Doziranje

16. Upotrebljavaju se najmanje tri visine doze i paralelna kontrola. Doze različitih visina treba primijeniti u određenim vremenskim razmacima kako bi se dobila gradacija toksičkog učinka. Osim u slučaju ograničenja zbog fizikalno-kemijske prirode ili bioloških svojstava kemikalije, treba odabrati najvišu dozu s ciljem izazivanja određene toksičnosti u majke (npr. kliničkih znakova, smanjenja porasta tjelesne mase (najviše 10 %) i/ili dokaza o toksičnosti na ciljnom organu zbog koje se mora ograničiti doza). Visoka doza može se ograničiti na 1 000 mg/kg/dan tjelesne mase, uz neke iznimke. Primjerice, očekivana izloženost ljudi može ukazati na potrebu za primjenom više doze. U suprotnom, trebalo bi provesti pokusne studije ili preliminarne studije za određivanje raspona kako bi se utvrdila najviša doza koju treba upotrebljavati koja bi trebala izazvati minimalni stupanj toksičnosti u majke. Ako je standardnom studijom razvojne toksičnosti ili pokusnom studijom dokazano da je ispitivana kemikalija razvojno toksična, najviša bi doza trebala biti maksimalna doza kojom se neće izazvati prekomjerna toksičnost u potomaka, smrt in utero ili neonatalna smrt ili malformacije, dostatna za isključivanje smislenog vrednovanja neurotoksičnosti. Najnižom dozom trebalo bi nastojati ne proizvesti nikakav dokaz toksičnosti niti za majku niti za plod u razvoju, uključujući neurotoksičnost. Kako bi se predočile sve reakcije povezane s dozom i doza kod koje nije zamijećen štetni učinak (NOAEL), treba odabrati niz sve nižih doza ili doze blizu granice detekcije kojima bi se omogućilo utvrđivanje referentne doze. Za utvrđivanje sve nižih razina doza često je najbolje doze primijeniti u dva do četiri kraća intervala te je često bolje dodati četvrtu skupinu koja prima određenu dozu nego između dva doziranja imati jako dugi interval (npr. gdje je faktor veći od 10).

17. Visine doza treba birati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti, kao i dodatne informacije o metabolizmu i toksikinetici ispitivane kemikalije ili srodnih materijala. Te informacije isto tako mogu biti korisne kod dokazivanja primjerenosti režima doziranja. Izravno doziranje mladuncima treba razmotriti na temelju informacija o izloženosti i farmakokinetičkih informacija (28) (29). Prije provođenja studija o izravnom doziranju treba pažljivo razmotriti koristi i nedostatke (30).

18. Usporedna kontrolna skupina treba biti placebo kontrolna skupina ili kontrolna skupina tretirana samo nosačem ako se kod primjene ispitivane kemikalije upotrebljava nosač. Svim životinjama treba obično dati isti volumen ispitivane kemikalije ili nosača na temelju tjelesne mase. Ako se radi lakšeg doziranja upotrebljava nosač ili drugi aditiv, treba uzeti u obzir sljedeće karakteristike: učinke na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili zadržavanje ispitivane kemikalije, učinke na kemijska svojstva ispitivane kemikalije koji mogu izmijeniti njezine toksične karakteristike te učinke na potrošnju hrane i vode ili nutritivno stanje životinja. Nosač ne bi smio dovesti do učinaka koji bi mogli ometati tumačenje studije i ne bi smio biti neurobihevioralno toksičan te imati učinke na reprodukciju ili razvoj. Pri novim nosačima, osim skupine tretirane nosačem, treba uključiti i kontrolnu skupinu tretiranu placebom. Sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati na jednak način kao sa životinjama u ispitnoj skupini.

▼M5

Primjena doza

19. Ispitivana kemikalija ili nosač trebali bi se primijeniti na način koji je najsličniji mogućoj izloženosti ljudi te na temelju dostupnih informacija o metabolizmu i distribuciji pri ispitnim životinjama. Treba općenito upotrebljavati oralni put primjene (npr. sondom, u hrani ili vodi za piće), ali se mogu primijeniti i drugi načini primjene (npr. dermalno, inhalacijom) ovisno o karakteristikama i očekivanim ili poznatim načinima izloženosti ljudi (daljnje smjernice nalaze se u Smjernici 43 (8)). Treba obrazložiti odabrani način primjene. Ispitivanu kemikaliju treba primjenjivati svakog dana po prilici u isto vrijeme.

20. Doza koja se daje svakoj životinji u pravilu uobičajeno bi se trebala temeljiti na najnovijem određivanju pojedinačne tjelesne mase. Međutim, pri prilagođavanju doza tijekom posljednjeg tromjesečja graviditeta potreban je oprez. Ako se pri tretiranim ženkama opazi previsoka toksičnost, te životinje treba humano usmrtiti.

21. Ispitivana kemikalija ili nosač trebali bi se davati barem jednom dnevno parenim ženkama od trenutka implantacije (6. dan gestacije) i tijekom laktacije (21. PND) tako da mladunci budu izloženi ispitivanoj kemikaliji tijekom prenatalnog i postnatalnog neurološkog razvoja. Dob u kojoj počinje doziranje te trajanje i učestalost doziranja mogu se prilagoditi ako postoje dokazi o planu pokusa koji je relevantniji za izloženost ljudi. Trajanja doziranja trebalo bi prilagoditi za ostale vrste kako bi se osigurala izloženost tijekom svih ranih razdoblja razvoja mozga (odnosno ekvivalentnih prenatalnom i ranom postnatalnom rastu ljudskog mozga). Doziranje može započeti od početka graviditeta (nulti gestacijski dan), iako treba razmotriti potencijal ispitivane kemikalije da uzrokuje predimplantacijski gubitak. Početkom primjene na šesti gestacijski dan taj bi se rizik izbjegao, ali se ne bi tretirale razvojne faze između nultog i šestoga gestacijskog dana. Ako laboratorij kupi već parene životinje, nepraktično je započeti doziranje na nulti gestacijski dan te bi stoga šesti gestacijski dan bio dobar početni dan. Ispitni bi laboratorij trebao odrediti režim doziranja u skladu s relevantnim informacijama o učincima ispitivane kemikalije, ranijim iskustvima i logističkim aspektima, što može uključivati produljenje doziranja nakon odbijanja od sise. Doziranje se ne bi trebalo obaviti na dan parturicije u onih životinja u kojih okot potomaka nije dovršen. Općenito, pretpostavlja se da će do izloženosti mladunaca doći majčinim mlijekom. Međutim, izravno doziranje mladuncima trebalo bi razmotriti u slučajevima nepostojanja dokaza o stalnoj izloženosti potomaka. Dokazi o stalnoj izloženosti mogu se naći, primjerice, u farmakokinetičkim informacijama, toksičnosti u potomaka ili promjenama u biomarkerima (28).

OPAŽANJA

Opažanja u ženki

22. Opažanja s obzirom na zdravstveno stanje, uključujući pobolijevanje i smrtnost, trebala bi se provoditi na svim ženkama najmanje jednom dnevno.

23. Tijekom razdoblja tretmana i opažanja trebalo bi periodično provoditi detaljnija klinička opažanja (najmanje dvaput tijekom gestacijskog razdoblja doziranja i dvaput tijekom laktacijskog razdoblja doziranja) upotrebom najmanje deset ženski po visini doze. Životinje bi izvan kaveza u kojem inače borave trebali promatrati obučeni tehničari koji nemaju informacija o tretmanu životinja upotrebom standardiziranih postupaka kako bi se ublažili stres u životinja i pristranost promatrača te maksimizirala njihova pouzdanost. Savjetuje se da, po mogućnosti, isti tehničar provodi opažanja u predmetnoj studiji.

▼M5

24. Treba bilježiti pojavu opaženih znakova. Kad god je to moguće, treba zabilježiti i jačinu opaženih znakova. Kliničkim opažanjima treba obuhvatiti, ali ne ih ograničiti na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, na pojavu iscjedaka i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija, piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju i/ili disanje na usta i svi neuobičajeni znaci uriniranja ili defekacije).

25. Isto tako treba zabilježiti i sve neuobičajene reakcije s obzirom na položaj tijela, razinu aktivnosti (npr. povećana ili smanjena upotreba standardnog prostora) i koordinaciju pokreta. Treba zabilježiti i promjene u hodu (npr. šepanje, ataksija), držanju (primjerice, zgrbljenost) i reakciju na manipulaciju, postavljanje ili druge podražaje okoline kao i pojavu kloničnih ili toničnih pokreta, konvulzija ili tremora, stereotipnog ponašanja (npr. prekomjerno njegovanje dlake, neobični pokreti glave, stalno kretanje u krug) ili čudnog ponašanja (npr. griženje ili pretjerano lizanje, samoranjavanje, hodanje unatrag, vokalizacija) ili agresiju.

26. Treba zabilježiti znakove toksičnosti, uključujući početni dan, doba dana, stupanj i trajanje.

27. Životinje bi trebalo izvagati u trenutku doziranja najmanje jednom tjedno tijekom studije, na dan okota ili oko njega te na 21. PND (odbijanje od sise). Pri studijama u kojima se primjenjuje hranjenje na sondu ženke bi trebalo vagati najmanje dvaput tjedno. Doze bi, prema potrebi, trebalo prilagoditi u trenutku svakog utvrđivanja tjelesne mase. Unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno tijekom gestacije i laktacije. Unos vode trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno ako do izloženosti dolazi opskrbom vodom.

Opažanja u potomaka

28. Svi bi se potomci trebalo pažljivo promatrati najmanje jednom dnevno radi znakova toksičnosti te pobolijevanja i smrtnosti.

29. Tijekom razdoblja tretmana i opažanja trebalo bi provoditi detaljnija klinička opažanja potomaka. Potomke (najmanje jedan mladunac po spolu i po leglu) bi trebali promatrati obučeni tehničari koji nemaju informacija o tretmanu životinja upotrebom standardiziranih postupaka kako bi se ublažila pristranost te maksimizirala pouzdanost promatrača. Savjetuje se da, po mogućnosti, isti tehničar provodi opažanja. Po potrebi bi trebalo pratiti barem krajnje točke opisane u stavcima 24. i 25. za razvojnu fazu koja se promatra.

30. Treba zabilježiti sve znakove toksičnosti u potomaka, uključujući početni dan, doba dana, stupanj i trajanje.

Fizičke i razvojne posebnosti

31. Promjene u razvojnim posebnostima prije odbijanja od sise (npr. odvajanje uške, otvaranje očiju, izbijanje sjekutića) blisko su povezane s tjelesnom masom (30) (31). Tjelesna masa može biti najbolji pokazatelj fizičkog razvoja. Zato se mjerenje razvojnih posebnosti preporučuje samo kad postoje raniji dokazi da će te krajnje točke pružiti dodatne informacije. Trenutak za procjenu tih parametara navodi se u tablici 1. Ovisno o očekivanim učincima i rezultatima početnih mjerenja, može se savjetovati dodavanje dodatnih vremenskih točaka ili obavljanje mjerenja u drugim razvojnim fazama.

▼M5

32. Pri procjeni fizičkog razvoja savjetuje se upotreba postkoitalne dobi umjesto postnatalne dobi (33). Ako se mladunci ispituju na dan odbijanja od sise, preporučuje se da se ispitivanje obavi prije odbijanja od sise kako bi se izbjegao zbunjujući učinak stresa povezanog s odbijanjem od sise. Osim toga, dva dana nakon odbijanja od sise ne bi trebalo obavljati nikakva ispitivanja mladunaca nakon odbijanja od sise.

Tablica 1.

Trenutak procjene fizičkih i razvojnih posebnosti te funkcionalnih/bihevioralnih krajnjih točaka ([a])

Dob / Krajnje točke	Prije odbijanja od sise ([b])	Adolescencija ([b])	Mlada odrasla dob ([b])
Fizičke i razvojne posebnosti			
Tjelesna masa i klinička opažanja	jednom tjedno ([c])	najmanje svaka dva tjedna	najmanje svaka dva tjedna
Težina mozga	22. PND ([d])		na završetku
Neuropatologija	22. PND ([d])		na završetku
Spolno sazrijevanje	—	prema potrebi	—
Ostale razvojne posebnosti ([e])	prema potrebi	—	—
Funkcionalne/bihevioralne krajnje točke			
Bihevioralna ontogeneza	Najmanje dvije vrijednosti		
Motorička aktivnost (uključujući habituaciju)	1–3 puta ([f])	—	jednom
Motorička i osjetilna funkcija	—	jednom	jednom
Učenje i pamćenje	—	jednom	jednom

([a]) U ovoj je tablici naveden najmanji broj trenutaka u kojima bi trebalo obaviti mjerenje. Ovisno o očekivanim učincima i rezultatima početnih mjerenja može biti preporučljivo dodavanje dodatnih vremenskih točaka (npr. ostarjele životinje) ili obavljanje mjerenja u drugim razvojnim fazama.

([b]) Preporučuje se da se mladunci ne ispituju tijekom dva dana od odbijanja od sise (vidjeti stavak 32.). Preporučena je dob za ispitivanje tijekom adolescencije: učenje i pamćenje = 25. PND ± 2; motorička i osjetilna funkcija = 25. PND ± 2. Preporučena je dob za ispitivanje mladih odraslih životinja 60. do 70. PND.

([c]) Tjelesna masa trebala bi se mjeriti najmanje dvaput tjedno kod izravnog doziranja mladuncima radi prilagodbe doza u vrijeme brzog porasta tjelesne mase.

([d]) Težina mozga i neuropatologija mogu se prema potrebi procijeniti ranije (npr. 11. PND) (vidjeti stavak 39.).

([e]) Ostale razvojne posebnosti osim tjelesne mase (npr. otvaranje očiju) trebale bi se bilježiti prema potrebi (vidjeti stavak 31.).

([f]) Vidjeti stavak 35.

33. Trebalo bi utvrditi broj i spol živih mladunaca, npr. vizualnim pregledom ili mjerenjem anogenitalnog razmaka (34) (35), a svaki bi se mladunac iz legla trebao pojedinačno izvagati pri okotu i ubrzo nakon njega, najmanje jednom tjedno tijekom laktacije te najmanje jednom svaka dva tjedna nakon toga. Kod vrednovanja spolnog sazrijevanja za najmanje jednog mužjaka i najmanje jednu ženku po leglu trebalo bi utvrditi dob i tjelesnu masu životinje kad dođe do vaginalne prohodnosti (36) ili razdvajanja prepucija (37).

▼M5

Bihevioralna ontogeneza

34. Ontogeneza odabranih ponašanja trebala bi se mjeriti u najmanje jednog mladunca po spolu i po leglu tijekom odgovarajuće dobi, pri čemu se isti mladunci upotrebljavaju svih dana ispitivanja za sva ponašanja koja se procjenjuju. Dani u kojima se obavljaju mjerenja trebali bi biti ravnomjerno raspoređeni tijekom tog razdoblja kako bi se utvrdilo uobičajeno ponašanje ili promjena povezana s tretmanom u ontogenezi tog ponašanja (38). U nastavku su navedeni neki primjeri ponašanja čija se ontogeneza mogla procijeniti: refleks uspravljanja, negativna geotaksija i motorička aktivnost (38)(39)(40).

Motorička aktivnost

35. Motoričku aktivnost treba pratiti (41) (42) (43) (44) (45) tijekom razdoblja prije odbijanja od sise i odrasle dobi. Za ispitivanje u vrijeme odbijanja od sise vidjeti stavak 32. Ispitivanje bi trebalo trajati dovoljno dugo da se pokaže navikavanje tijekom ispitivanja kod netretiranih kontrolnih skupina. Osobito se preporučuje upotreba motoričke aktivnosti za procjenu bihevioralne ontogeneze. Ako se ono upotrebljava kao ispitivanje bihevioralne ontogeneze, tada bi se za ispitivanje trebale upotrebljavati iste životinje kod svih ispitivanja prije odbijanja od sise. Ispitivanje bi trebalo provoditi dovoljno često kako bi se procijenila ontogeneza habituacije tijekom ispitivanja (44). To može značiti tri vremenska razdoblja ili više njih prije dana odbijanja od sise, uključujući i taj dan (npr. 13., 17., 21. PND). Ispitivanje istih životinja ili članova legla trebalo bi se obaviti i u odrasloj dobi blizu završetka studije (npr. 60. do 70. PND). Ispitivanje u dodatnim danima može se obaviti prema potrebi. Motorička aktivnost trebala bi se pratiti automatskim aparatom za bilježenje aktivnosti kojim se može utvrditi povećanje i smanjenje aktivnosti (odnosno osnovna aktivnosti koju uređaj mjeri ne bi smjela biti toliko niska da to spriječi utvrđivanje smanjenja niti toliko visoka da to spriječi utvrđivanje povećanja aktivnosti). Svaki bi se uređaj trebao ispitati standardnim postupcima kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri osigurala pouzdanost rada svih uređaja i u sve dane. Tretirane skupine bi u najvećoj mogućoj mjeri trebalo rasporediti na sve uređaje. Svaka bi se životinja trebala ispitivati pojedinačno. Tretirane skupine trebale bi biti raspoređene na sva vremena ispitivanja kako bi se izbjeglo zbunjivanje zbog cirkadijurnih ritmova aktivnosti. Trebalo bi nastojati da varijacije ispitnih uvjeta budu minimalne te da nisu sustavno povezane s tretiranjem. Među varijablama koje mogu utjecati na brojne vrijednosti ponašanja, uključujući motoričku aktivnost, nalaze se razina buke, veličina i oblik ispitnog kaveza, temperatura, relativna vlažnost, svjetlosni uvjeti, mirisi, upotreba kaveza u kojem životinje inače borave ili novog ispitnog kaveza te distrakcije iz okoline.

Motorička i osjetilna funkcija

36. Motorička i osjetilna funkcija trebala bi se detaljno ispitivati najmanje jednom u adolescentnoj dobi te jednom tijekom razdoblja rane odrasle dobi (npr. 60. do 70. PND). Za ispitivanje u vrijeme odbijanja od sise vidjeti stavak 32. Treba provesti dovoljno ispitivanja kako bi se osiguralo odgovarajuće količinsko uzorkovanje osjetilnih modaliteta (npr. somatosenzorni, vestibularni) i motoričkih funkcija (npr. snaga, koordinacija). Neki su primjeri ispitivanja motoričke i osjetilne funkcije refleks pružanja ekstenzora (46), refleks uspravljanja (47) (48), habituacija na iznenadnu buku (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54) i evocirani potencijali (55).

▼M5

Ispitivanja učenja i pamćenja

37. Trebalo bi provesti ispitivanje asocijativnog učenja i pamćenja nakon odbijanja od sise (npr. 25. dan ± 2) i u mladih odraslih životinja (60. PND i starijih). Za ispitivanje u vrijeme odbijanja od sise vidjeti stavak 32. Ista ili zasebna ispitivanja mogu se upotrijebiti u ovim dvjema fazama razvoja. Dopušta se određena fleksibilnost kod odabira ispitivanja učenja i pamćenja u štakora koji se odbijaju od sise i odraslih štakora. Međutim, ispitivanja bi trebala biti oblikovana tako da se ispune dva kriterija. Kao prvo, učenje bi se trebalo procjenjivati kao promjena među nekoliko ponovljenih postupaka učenja ili prilikom ispitivanja koja uključuju jedan postupak učenja s upućivanjem na uvjet kojim se kontroliraju neasocijativni učinci iskustva učenja. Kao drugo, ispitivanja bi trebala uključivati neku vrstu mjerne vrijednosti pamćenja (kratkoročnog ili dugoročnog) osim izvornog učenja (stjecanja), ali se ona ne može navesti zbog izostanka mjerne vrijednosti stjecanja dobivene istim ispitivanjem. Ako se ispitivanjima učenja i pamćenja otkrije učinak ispitivane kemikalije, mogu se razmotriti dodatna ispitivanja kako bi se isključila alternativna tumačenja na temelju promjena u osjetilnim, motivacijskim i/ili motoričkim sposobnostima. Uz gornja dva kriterija, preporučuje se odabir ispitivanja učenja i pamćenja na temelju njegove dokazane osjetljivosti na klasu opasnosti kemikalije koja se ispituje, ako su takve informacije dostupne u literaturi. U izostanku takvih informacija primjeri ispitivanja koja bi mogla ispuniti gornje kriterije uključuju pasivno izbjegavanje (43) (56) (57), zakašnjeli dolazak na položaj u odraslih štakora (58) i u mladih štakora (59), olfaktorno kondicioniranje (43) (60), Morrisov vodeni labirint (61) (62) (63), labirint vrste Biel ili Cincinnati (64) (65), labirint s radijalnim kracima (66), labirint u obliku slova T (43) te stjecanje i zadržavanje ponašanja kontroliranog rasporedom (26) (67) (68). Dodatna ispitivanja opisana su u literaturi za štakore koji se odbijaju od sise (26) (27) i odrasle štakore (19) (20).

Pregled post-mortem

38. Majke se može eutanazirati nakon odbijanja potomaka od sise.

39. Neuropatološko vrednovanje potomaka obavit će se s pomoću tkiva životinja koje su humano usmrćene 22. postnatalnog dana ili ranije u razdoblju između 11. i 22. postnatalnog dana, kao i nakon završetka studije. U potomaka usmrćenih do 22. postnatalnog dana trebalo bi vrednovati moždana tkiva, a u životinja usmrćenih po završetku studije tkiva središnjeg i perifernog živčanog sustava. Životinje usmrćene na 22. PND ili ranije mogu se fiksirati uranjanjem ili perfuzijom. Životinje usmrćene nakon završetka studije trebale bi se fiksirati perfuzijom. Svi aspekti pripreme uzoraka tkiva, od perfuzije životinja, preko disekcije uzoraka tkiva, obrada tkiva te bojenje preparata trebali bi se obaviti prema uravnoteženom planu tako da svaka serija uključuje reprezentativne uzorke svake skupine koja je primala određenu dozu. Dodatne smjernice o neuropatologiji nalaze se u OECD-ovoj Smjernici br. 20 (9), vidjeti i (103).

Obrada uzoraka tkiva

40. Treba zabilježiti sve velike abnormalnosti vidljive u trenutku nekropsije. Uzeti uzorci tkiva trebali bi predstavljati sve glavne regije živčanog sustava. Uzorci tkiva trebali bi se čuvati u odgovarajućem fiksativu i obraditi prema standardiziranim objavljenim histološkim protokolima (69) (70) (71) (103). Uklapanje u parafin prihvatljivo je za tkiva središnjeg i perifernog živčanog

▼M5

sustava, ali upotreba osmija nakon fiksacije, uz uklapanje u epoksi-smolu, može biti primjerena ako je potreban viši stupanj rezolucije (npr. za periferne živce kad se sumnja na perifernu neuropatiju i/ili za morfometrijsku analizu perifernih živaca). Moždano tkivo prikupljeno za morfometrijsku analizu trebalo bi uklopiti u odgovarajući medij na svim visinama doze u isto vrijeme kako bi se izbjegli artefakti skupljanja koji mogu biti povezani s produljenim stajanjem u fiksativu (6).

Neuropatološki pregled

41. Svrha kvalitativnih pregleda je:

i. utvrditi regije živčanog sustava pri kojima su uočljivi dokazi neuropatoloških promjena;

ii. utvrditi vrste neuropatoloških promjena koje su posljedica izloženosti ispitivanoj kemikaliji;

iii. utvrditi raspon težine neuropatoloških promjena.

Odgovarajuće osposobljeni patolog trebao bi mikroskopski pregledati reprezentativne histološke sekcije uzoraka tkiva radi dokazivanja neuropatoloških promjena. Svim neuropatološkim promjenama treba dodijeliti subjektivnu ocjenu kojom se opisuje njihova težina. Bojenje hematoksilinom i eozinom može biti dostatno za vrednovanje sekcija mozga životinja koje su humano usmrćene 22. postnatalnog dana ili ranije. Međutim, bojenje mijelina (npr. luxol fast plavom/cresyl ljubičastom) i bojenje srebrom (npr. Bielschowskyjevom ili Bodianovom bojom) preporučuju se kod sekcija tkiva središnjeg i perifernog živčanog sustava životinja usmrćenih nakon završetka studije. U skladu sa stručnom prosudbom patologa i vrstom uočenih promjena druge se boje mogu smatrati primjerenima za identifikaciju i karakterizaciju određenih vrsta promjena (npr. glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) ili histokemija lektina za procjenu glijalnih i mikroglijalnih promjena (72), fluoro-žad za utvrđivanje nekroze (73) (74) ili srebrno bojenje specifično za neuralnu degeneraciju (75)).

42. Morfometričko (količinsko) vrednovanje trebalo bi se obaviti jer ti podaci mogu biti korisni kod utvrđivanja učinka koji je povezan s tretiranjem te tumačenja razlika povezanih s tretiranjem u težini ili morfologiji mozga (76) (77). Uzorci tkiva živčanog sustava trebaju se uzeti i pripremiti kako bi se omogućilo morfometričko vrednovanje. Morfometrička vrednovanja mogu uključivati npr. linearna ili prostorna mjerenja određenih regija mozga (78). Za linearna ili prostorna mjerenja potrebna je upotreba homolognih sekcija koje su pažljivo odabrane na temelju pouzdanih mikroskopskih posebnosti (6). Stereologija se može upotrebljavati za identifikaciju učinaka povezanih s tretiranjem na parametre poput volumena ili broja stanica za specifične neuroanatomske regije (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. Mozgove treba pregledati radi dokazivanja svih neuropatoloških promjena povezanih s tretiranjem te treba uzeti odgovarajuće uzorke iz svih glavnih regija mozga (npr. iz olfaktornog bulbusa, cerebralnog korteksa, hipokampusa, bazalnih ganglija, talamusa, hipotalamusa, srednjeg mozga (krova, tegmentuma i moždanih krakova), mosta, produžene moždine, malog mozga) kako bi se osigurao temeljit pregled. Važno je da se sekcije u svih životinja uzimaju u istoj ravnini. U odraslih životinja koje su humano usmrćene nakon završetka studije trebalo bi uzeti uzorak reprezentativnih sekcija leđne moždine i perifernog živčanog sustava. Pregledana područja trebala bi uključivati oko s vidnim živcem i mrežnicu, leđnu moždinu na cervikalnom i lumbarnom zadebljanju, dorzalne i ventralne korjenove, proksimalni ishijadični živac, proksimalni tibijalni živac (na koljenu) i ogranke tibijalnog živca u lisnom mišiću. Sekcije leđne moždine i perifernog živca trebale bi obuhvatiti i poprečne ili dijagonalne i uzdužne sekcije.

▼M5

44. Neuropatološko vrednovanje trebalo bi uključivati pregled radi utvrđivanja naznaka razvojnih oštećenja živčanog sustava (6) (85) (86) (87) (88) (89), uz stanične promjene (npr. neuronska vakuolacija, degeneracija, nekroza) i promjene tkiva (npr. glioza, infiltracija leukocita, nastanak cista). U tom je pogledu važno razlikovati učinke povezane s tretiranjem od uobičajenih razvojnih događaja za koje je poznato da se odvijaju u razvojnoj fazi koja odgovara trenutku usmrćivanja (90). Primjeri znatnih promjena koje ukazuju na razvojni inzult uključuju, ali se ne ograničavaju na:

— promjene u veličini ili obliku olfaktornog bulbusa, mozga ili malog mozga,

— promjene u relativnoj veličini različitih regija mozga, uključujući smanjenja ili povećanja veličine regija koje su posljedica gubitka ili postojanosti uobičajeno prolaznih populacija stanica ili aksonalnih projekcija (npr. vanjski zametni sloj cerebeluma, žuljevito tijelo),

— promjene u proliferaciji, migraciji i diferencijaciji na što upućuju područja prekomjerne apoptoze ili nekroze, nakupine ili raspršene populacije ektopijskih stanica, dezorijentirani ili malformirani neuroni ili promjene u relativnoj veličini različitih slojeva kortikalnih struktura,

— promjene u uzorcima mijelinacije, uključujući ukupno smanjenje veličine ili promijenjeno bojenje mijeliniranih struktura,

— dokaze hidrocefalusa, osobito povećanje klijetki, stenozu cerebralnog akvedukta i stanjivanje moždanih polutki.

Analiza odnosa doza-reakcija neuropatoloških promjena

45. Sljedeći se fazni postupak preporučuje za kvalitativnu i kvantitativnu neuropatološku analizu. Kao prvo, sekcije iz skupine koja je primala visoku dozu uspoređuju se sa sekcijama kontrolne skupine. Ako nema dokaza o neuropatološkim promjenama u životinja iz skupine koja je primala visoku dozu, nije potrebna daljnja analiza. Ako postoje dokazi o neuropatološkim promjenama u skupini koja je primala visoku dozu, pregledavaju se životinje iz skupina koje su primale srednju odnosno nisku dozu. Ako se skupina koja je primala visoku dozu uništi zbog smrti ili druge zbunjujuće toksičnosti, trebalo bi analizirati skupine koje su primale visoke odnosno srednje doze radi neuropatoloških promjena. Ako je u skupina koje su primale niže doze uočena neuropatologija, potrebno je obaviti neuropatološku analizu tih skupina. Ako se pri kvalitativnom ili kvantitativnom pregledu utvrde bilo kakve neuropatološke promjene povezane s tretiranjem, na temelju vrednovanja svih životinja iz svih skupina koje su primale određenu dozu trebalo bi utvrditi ovisnost pojave o dozi, učestalost i stupanj težine lezija ili morfometričkih promjena. Tim vrednovanjem treba obuhvatiti sve regije mozga kod kojih su uočeni dokazi o neuropatološkim promjenama. Za svaku vrstu lezija treba opisati obilježja koja se upotrebljavaju za utvrđivanje svih stupnjeva težine, navodeći svojstva za razlikovanje svakog stupnja. Treba zabilježiti učestalost pojave svake vrste lezije i njezin stupanj težine te izvršiti statističku analizu kako bi se ocijenila priroda odnosa doza-reakcija. Preporučuje se upotreba kodiranih mikroskopskih preparata (91).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

46. Podaci bi se trebali dostavljati pojedinačno i sažeti u tablici navođenjem za svaku ispitnu skupinu vrste promjena i broja ženki, potomaka po spolu te legla kod kojih je uočena svaka vrsta promjene. Ako je izvršeno izravno postnatalno izlaganje potomaka, treba zabilježiti način, trajanje i razdoblje izloženosti.

▼M5

Vrednovanje i tumačenje rezultata

47. Studija razvojne neurotoksičnosti pružit će informacije o učincima višekratnog izlaganja kemikaliji tijekom razvoja in utero i ranog postnatalnog razvoja. Kako je naglasak stavljen i na opću toksičnost i na krajnje točke razvojne neurotoksičnosti, rezultati studije omogućit će razlikovanje neurorazvojnih učinaka koji se javljaju u izostanku opće toksičnosti u majke i onih koji se javljaju samo kod doza koje su toksične i za majku. Zahvaljujući složenom međuodnosu dizajna studije, statističke analize i biološkog značaja podataka odgovarajuće tumačenje podataka o razvojnoj neurotoksičnosti uključivat će stručno mišljenje (107) (109). Pri tumačenju rezultata ispitivanja treba upotrebljavati pristup koji se temelji na važnosti dokaza (20) (92) (93) (94). Treba raspravljati o uzorcima bihevioralnih ili morfoloških nalaza, ako postoje, kao i dokazima u pogledu doze-reakcije. U tu karakterizaciju treba uključiti podatke iz svih studija relevantnih za vrednovanje razvojne neurotoksičnosti, uključujući epidemiološke studije na ljudima ili izvješća o slučajevima te eksperimentalnih studija na životinjama (npr. toksokinetičke podatke, informacije o odnosu strukture i djelovanja, podatke iz drugih studija toksičnosti). To uključuje i odnos između doza ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, pojave i opsega svih neurotoksičnih učinaka kod svakog spola (20) (95).

48. Vrednovanjem podataka treba obuhvatiti i raspravu o biološkoj i statističkoj značajnosti. Statistička analiza trebala bi se smatrati alatom kojim se usmjerava, a ne utvrđuje tumačenje podataka. Izostanak statističke značajnosti ne bi trebao biti jedini razlog za zaključak o izostanku učinka povezanog s tretiranjem, kao što ni statistička značajnost ne bi trebala biti jedino opravdanje za zaključak o učinku povezanom s tretiranjem. Kako bi se spriječili mogući lažno negativni nalazi i inherentne poteškoće pri „dokazivanju negativnog nalaza”, trebalo bi razmotriti dostupne pozitivne i povijesne kontrolne podatke, osobito ako nema učinaka povezanih s tretiranjem (102) (106). Vjerojatnost lažno negativnih nalaza trebalo bi razmotriti u smislu ukupnog statističkog vrednovanja podataka (96). Vrednovanje bi trebalo uključivati odnos, ako postoji, između uočenih neuropatoloških i bihevioralnih promjena.

49. Sve bi rezultate trebalo analizirati s pomoću statističkih modela koji odgovaraju planu pokusa (108). Odabir parametrijske ili neparametrijske analize treba obrazložiti uzimajući u obzir čimbenike poput prirode podataka (transformirani ili netransformirani) i njihove distribucije, kao i relativne robusnosti odabrane statističke analize. Odabir statističke analize trebao bi se temeljiti na svrsi i dizajnu studije kako bi se pogreške vrste I. (lažno pozitivni nalazi) i vrste II. (lažno negativni nalazi) svele na najmanju moguću mjeru (96) (97) (104) (105). Statističkim modelom razvojnih studija u kojima se upotrebljavaju vrste koje mogu okotiti više mladunaca u kojima se ispituje više mladunaca iz legla trebala bi biti obuhvaćena legla kako bi se spriječio porast stopa pogrešaka vrste I. (98) (99) (100) (101). Statistička mjerna jedinica trebala bi biti leglo, a ne mladunac. Pokusi bi se trebali provoditi tako da se članovi istog legla ne tretiraju kao neovisna opažanja. Sve krajnje točke koje su višekratno izmjerene kod istog predmeta pokusa trebale bi se analizirati s pomoću statističkih modela kojima se uzima u obzir činjenica da te izmjerene vrijednosti nisu neovisne.

Izvješće o ispitivanju

50. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

— fizikalna svojstva, i prema potrebi, fiziokemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju, uključujući podrijetlo,

▼M5

— čistoća pripravka te poznate i/ili očekivane nečistoć.,

Nosač (prema potrebi)

— obrazloženje za odabir nosača, ako nije riječ o vodi ili fiziološkoj otopini.

Pokusne životinje

— upotrijebljena vrsta i soj te obrazloženje ako se ne radi o štakorima,

— dobavljač pokusnih životinja,

— broj, starost na početku ispitivanja i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana, voda itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja.

Uvjeti ispitivanja

— podloge za odabir visine doze,

— podloge za način doziranja i vremensko razdoblje,

— specifikacije primijenjenih doza, uključujući pojedinosti o nosaču, volumenu i fizičkom obliku primijenjenog materijala,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripravku u hrani, postignutoj koncentraciji, stabilnosti i homogenosti pripravka,

— metoda za jedinstvenu identifikaciju ženki i potomaka,

— detaljan opis postupaka slučajnog odabira za raspodjelu ženki u skupine za tretiranje, za odabir mladunaca za izdvajanje te za raspodjelu mladunaca u ispitne skupine,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— način preračunavanja koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće ili inhalatu (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne mase/dan), prema potrebi,

— okolišni uvjeti,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (npr. iz slavine, destilirana),

— datum početka i završetka studije.

Opažanja i ispitni postupci

— detaljan opis postupaka upotrijebljenih za standardizaciju opažanja i postupaka, kao i operativne definicije za bodovanje opažanja,

— popis svih upotrijebljenih ispitnih postupaka i obrazloženje za njihovu upotrebu,

— pojedinosti o upotrijebljenim bihevioralnim/funkcionalnim, patološkim, neurokemijskim ili elektrofiziološkim postupcima, uključujući informacije i pojedinosti o automatskim uređajima,

— postupci za kalibriranje i osiguranje istovjetnosti uređaja i ujednačavanje skupina za tretiranje u ispitnim postupcima,

— kratko obrazloženje svih odluka koje uključuju stručno mišljenje.

▼M5

Rezultati (pojedinačni i sažeti, uključujući srednje vrijednosti i varijance prema potrebi)

— broj životinja na početku i na završetku studije,

— broj životinja i legala upotrijebljenih za svaku ispitnu metodu,

— identifikacijski broj svake životinje i leglo iz kojeg potječe,

— veličina legla i srednja težina pri okotu i po spolu,

— tjelesna masa i podaci o promjeni tjelesne mase, uključujući tjelesnu masu ženki i potomaka kod usmrćenja,

— podaci o unosu hrane te, prema potrebi, o unosu vode (npr. ako se ispitivana kemikalija daje s vodom),

— podaci o toksičnoj reakciji po spolu i visini doze, uključujući znakove toksičnosti ili smrtnost, uključujući vrijeme i uzrok smrti, prema potrebi,

— priroda, težina, trajanje, dan početka, doba dana te naknadni tijek detaljnih kliničkih opažanja,

— bodovanje svake razvojne posebnosti (težina, spolno sazrijevanje i bihevioralna ontogeneza) u svim vremenima opažanja,

— detaljan opis svih bihevioralnih, funkcionalnih, neuropatoloških, neurokemijskih i elektrofizioloških nalaza po spolu, uključujući povećanja i smanjenja u usporedbi s kontrolnim skupinama,

— nalazi nekropsije,

— težina mozga,

— sve dijagnoze postavljene na temelju neuroloških znakova i lezija, uključujući prirodne bolesti ili stanja,

— slike egzemplarnih nalaza,

— mikroskopske slike za procjenu homologije sekcija upotrijebljenih za morfometriju,

— podaci o apsorpciji i metabolizmu, uključujući komplementarne podatke iz zasebne toksokinetičke studije, ako su dostupni,

— statistička analiza rezultata, uključujući statističke modele upotrijebljene za analizu podataka te rezultati neovisno o tome jesu li značajni ili ne,

— popis osoblja koje je sudjelovalo u studiji, uključujući stručno usavršavanje.

Rasprava o rezultatima

— informacije o dozi-reakciji po spolu i skupini,

— utjecaj ostalih toksičnih učinaka na zaključak o neurotoksičnom potencijalu ispitivane kemikalije po spolu i skupini,

— utjecaj toksokinetičkih informacija na zaključke,

— sličnosti učinaka s učincima poznatih neurotoksičnih tvari,

▼M5

— podaci kojima se potvrđuje pouzdanost i osjetljivost ispitne metode (npr. pozitivni i povijesni kontrolni podaci),

— odnosi, ako postoje, između neuropatoloških i funkcionalnih učinaka,

— vrijednosti kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL) ili referentna doza za ženke i potomke po spolu i skupini.

Zaključci

— rasprava o sveukupnom tumačenju podataka na temelju rezultata, uključujući zaključak o tome je li razvojna neurotoksičnost posljedica ispitivane kemikalije ili ne te o vrijednostima kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL).

LITERATURA

(1) OECD (1995.). Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kopenhagen, Danska, od 13. do 14. lipnja 1995.

(2) US EPA (1998.). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Dostupno na: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998.). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Dostupno na: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001.). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79. 91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001.). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101. 111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001.). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93. 100.

(7) OECD (2003.). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., SAD, od 23. do 25. listopada 2000.

(8) OECD (2008.). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Pariz. srpanj 2008. Dostupno na: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

(9) OECD (2003.). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Pariz, rujan 2003. Dostupno na: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990.) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000.) Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002.) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188..197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998.) Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Poglavlje B.34. ovog Priloga, Studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji.

(15) Poglavlje B.35. ovog Priloga, Studija reproduktivne toksičnosti na dvije generacije.

(16) Poglavlje B.43. ovog Priloga, Studija neurotoksičnosti kod glodavaca.

(17) Poglavlje B.31. ovog Priloga, Studija prenatalne razvojne toksičnosti.

(18) Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

(19) WHO (1986.) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Dostupno na: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001.) Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Dostupno na: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995.) Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997.) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499. 509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997.) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2. 6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977.) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989.) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118. 136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979.) Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987.) Perinatal Development: A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003.) Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005.) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87. 94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999.) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1. 4.

(31) ICH (1993.) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987.) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433. 439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998.) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449. 457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999.) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383. 390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000.) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350. 365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985.) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579. - 586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977.) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298. 303.

(38) Spear, L.P. (1990.) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489. - 95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975.) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896. 920.

(40) Adams, J. (1986.) Methods in Behavioral Teratology. U: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67. 100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979.) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53. 66.

(42) Robbins, T.W. (1977.) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, str. 37. 82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993.) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117. - 129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985.) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247. - 260.

(45) 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: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599. 609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997.) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405. 411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998.) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661. 669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977.) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589. 591.

(49) Davis, M. (1984.) The mammalian startle response. U: Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, str. 287. 351.

(50) Koch, M. (1999.) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107. 128.

(51) Crofton, K.M. (1992.) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. U Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, str. 181. 211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989.) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199. 211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994.) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25. – 30.

(54) Ison, J.R. (1984.) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437. – 445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992.) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. U: Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. str. 125. 145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990.) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321. 332.

(57) Bammer, G. (1982.) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247. 296.

(58) Bushnell, P.J. (1988.) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237. 244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989.) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98. 105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984.) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465. 479.

(61) Morris, R. (1984.) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47. 60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989.) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29. 69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001.) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60. 90.

(64) Vorhees, C.V. (1987.) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235. 241.

(65) Vorhees, C.V. (1997.) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387. 399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988.) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327. 332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983.) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342. 352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981.) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338. – 341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000.) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122. 131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994.) Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, DC, str. 84. 107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002.) Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996.) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291. 304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000.) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123. 130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001.) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365. 372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994.) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545. 561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005.a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745. 755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005.b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417. 432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979.) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129. – 135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998.) Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998.) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305. 310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993.) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262. 268.

(82) Schmitz, C. (1997.) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707. 710.

(83) West, M.J. (1999.) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51. 61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005.) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813. – 831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994.) Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113. 121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995.) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294. 298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998.) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. U: Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, str. 3. 41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999.) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70. 74.

▼**M5**

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000.) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056. – 1060.

(90) Friede, R. L. (1989.) Developmental Neuropathology. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992.) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127. 133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996.) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401. 405.

(93) US EPA (2005.) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996.) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274. 56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995.) Neurotoxicology. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984.). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113. 126.

(97) Gad, S.C. (1989.) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21 27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973.) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329. 335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975.) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165. 172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992.) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221. 228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985.) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587. 90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004.) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345. 352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006.) A „best practices" approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34:296. 313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992.) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205. 210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985.) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295. 301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008.) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):266. 287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008.) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):288. 325.

▼**M5**

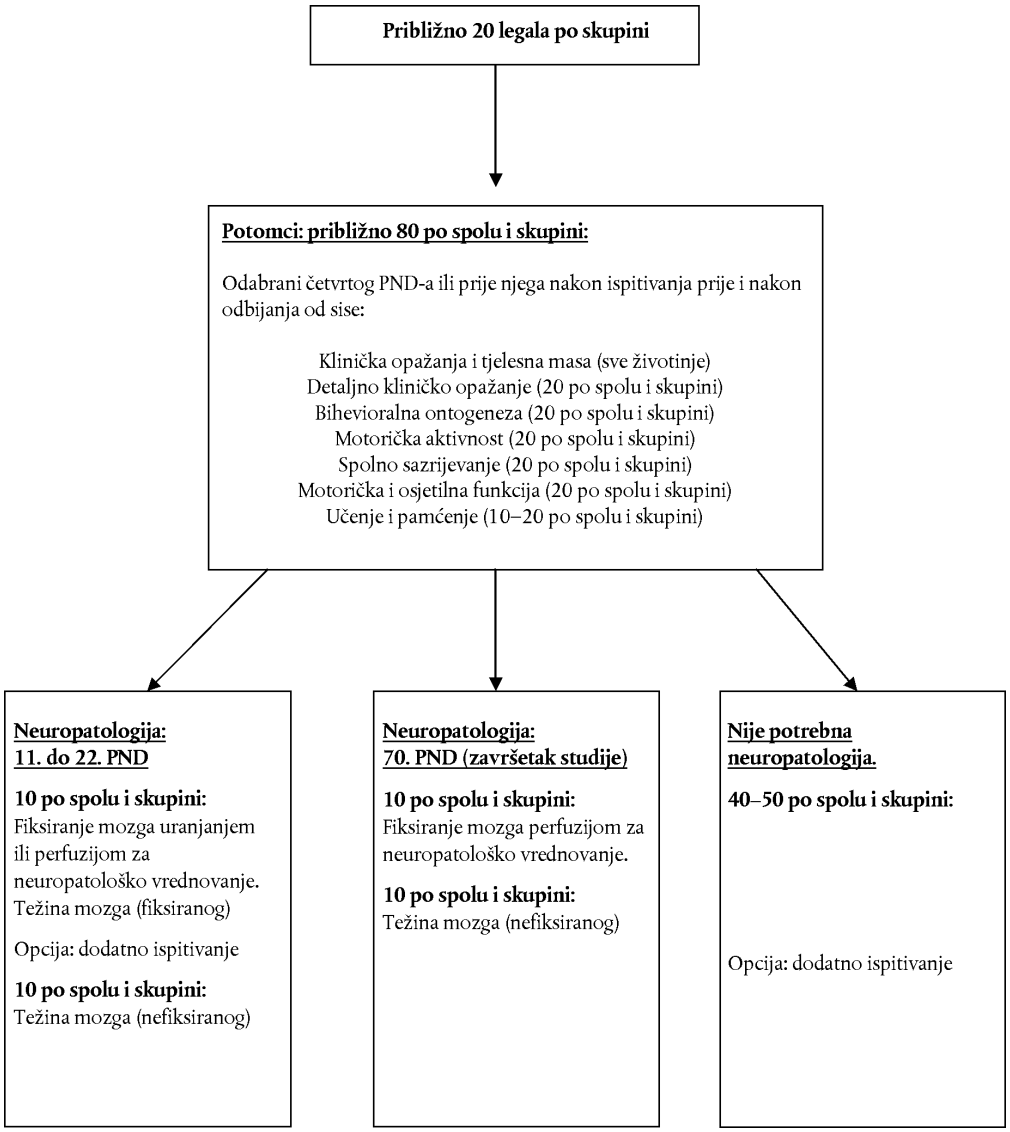
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008.) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):326. 348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008.) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints Neurotoxicology and Teratology, 30(4):349. 381.

▼**M5**

Slika 1.

Opća shema ispitivanja za funkcionalna/bihevioralna ispitivanja, neuropatološko vrednovanje i težinu mozga. Ovaj se dijagram temelji na opisu iz stavaka 13–15. (PND = postnatalni dan). Primjeri raspodjele životinja nalaze su u Dodatku 1.



▼M5

Dodatak 1.

1. Primjeri mogućih raspodjela opisani su i prikazani u tablicama u nastavku. Ti su primjeri navedeni kako bi se pokazalo da se raspodjela životinja koje se upotrebljavaju u studiji različitim ispitnim paradigmama može postići na nekoliko različitih načina.

Primjer 1.

2. Jedna skupina od 20 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za ispitivanje bihevioralne ontogeneze prije odbijanja od sise. Od tih životinja 10 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) humano se usmrćuju 22. postnatalnog dana. Mozgovi se odstranjuju, važu i obrađuju za histopatološko vrednovanje. Osim toga, podaci o težini mozga prikupljaju se upotrebom nefiksiranih mozgova preostalih 10 mužjaka i 10 ženki po visini doze.

3. Druga skupina od 20 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za funkcionalna/bihevioralna ispitivanja nakon odbijanja od sise (detaljna klinička opažanja, motorička aktivnost, reakcija na iznenadnu buku i ispitivanje kognitivne funkcije u adolescentnih životinja) te procjenu dobi spolnog sazrijevanja. Od tih životinja 10 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) anesteziraju se i fiksiraju perfuzijom na završetku studije (približno 70. PDN). Nakon dodatnog fiksiranja in situ mozak se uklanja i obrađuje za neuropatološko vrednovanje.

4. Za ispitivanje kognitivne funkcije u mladih odraslih životinja (npr. 60. do 70. PND) upotrebljava se treća skupina od 20 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu). Od tih životinja 10 životinja po spolu i po skupini (1 mužjak i 1 ženka po leglu) usmrćuju se na završetku studije, a mozak se odstranjuje i važe.

5. Preostalih 20 životinja po spolu i po skupini čuva se za moguća dodatna ispitivanja.

Tablica 1.

Br. mladunca ([a])		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
1	5	20 m + 20 ž	Bihevioralna ontogeneza
		10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/morfometrija na 22. PND
		10 m + 10 ž	Težina mozga na 22. PND
2	6	20 m + 20 ž	Detaljna klinička opažanja
		20 m + 20 ž	Motorička aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolno sazrijevanje
		20 m + 20 ž	Motorička i osjetilna funkcija
		20 m + 20 ž	Učenje i pamćenje (25. PND)
		10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/morfometrija u mladih odraslih životinja ~ 70. PND

▼M5

Br. mladunca (a)		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
3	7	20 m + 20 ž	Učenje i pamćenje (mlade odrasle životinje)
		10 m + 10 ž	Težina mozga u mladih odraslih životinja ~ 70. PND
4	8	—	Rezervne životinje kao zamjena ili za dodatna ispitivanja

(a) U ovom se primjeru legla sastoje od 4 mužjaka + 4 ženke; muški su mladunci označeni brojevima od 1 do 4, a ženke mladunci od 5 do 8.

Primjer 2.

6. Jedna skupina od 20 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za ispitivanje bihevioralne ontogeneze prije odbijanja od sise. Od tih životinja 10 mladunaca po spolu i po visini doze (1 mužjak i 1 ženka po leglu) humano se usmrćuju 11. postnatalnog dana. Mozgovi se odstranjuju, važu i obrađuju za histopatološko vrednovanje.

7. Druga skupina od 20 životinja po spolu i po visini doze (1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za preglede nakon odbijanja od sise (detaljna klinička opažanja, motorička aktivnost, procjena dobi spolnog sazrijevanja te motorička i osjetilna funkcija). Od tih životinja 10 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) anesteziraju se i fiksiraju perfuzijom na završetku studije (približno 70. PDN). Nakon dodatnog fiksiranja in situ mozak se uklanja, važe i obrađuje za neuropatološko vrednovanje.

8. Za ispitivanje kognitivne funkcije u adolescentnih i mladih odraslih životinja upotrebljava se 10 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu). Za ispitivanje kognitivne funkcije na 23. postnatalni dan i u mladih odraslih životinja upotrebljavaju se različite životinje. Na završetku studije 10 životinja po spolu i po skupini koje su ispitivane kao odrasle usmrćuju se, a mozak se odstranjuje i važe.

9. Preostalih 20 životinja po spolu i po skupini koje nisu odabrane za ispitivanje usmrćuju se i izlučuju kod odbijanja od sise.

Tablica 2.

Br. mladunca (a)		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
1	5	20 m + 20 ž	Bihevioralna ontogeneza
		10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/ morfometrija na 11. PND
2	6	20 m + 20 ž	Detaljna klinička opažanja
		20 m + 20 ž	Motorička aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolno sazrijevanje
		20 m + 20 ž	Motorička i osjetilna funkcija
		10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/ morfometrija u mladih odraslih životinja ~ 70. PND

▼**M5**

Br. mladunca ([a])		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
3	7	10 m + 10 ž ([b])	Učenje i pamćenje (23. PND)
3	7	10 m + 10 ž ([b])	Učenje i pamćenje (mlade odrasle životinje) Težina mozga u mladih odraslih životinja
4	8	—	Životinje koje su usmrćene i izlučene 21. postnatalnog dana.

([a]) U ovom se primjeru legla sastoje od 4 mužjaka + 4 ženke; muški su mladunci označeni brojevima od 1 do 4, a ženke mladunci od 5 do 8.
([b]) Različiti se mladunci upotrebljavaju za kognitivna ispitivanja na 23. PND i u mladih odraslih životinja (npr. parna/neparna legla od ukupno njih 20).

Primjer 3.

10. Jedna skupina od 20 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za procjenu težine mozga i neuropatologije na 11. PND. Od tih životinja 10 mladunaca po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) humano se usmrćuju 11. postnatalnog dana, a mozgovi se odstranjuju, važu i obrađuju za histopatološko vrednovanje. Osim toga, podaci o težini mozga prikupljaju se upotrebom nefiksiranih mozgova preostalih 10 mužjaka i 10 ženki po visini doze.

11. Druga skupina od 20 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za bihevioralnu ontogenezu (motorička aktivnost), preglede nakon odbijanja od sise (motorička aktivnost i procjena dobi spolnog sazrijevanja) te ispitivanje kognitivne funkcije u adolescentnih životinja.

12. Druga skupina od 20 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) upotrebljava se za ispitivanja motoričke i osjetilne funkcije (reakcija na iznenadnu buku) i detaljna klinička opažanja. Od tih životinja 10 životinja po spolu i po visini doze (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) anesteziraju se i fiksiraju perfuzijom na završetku studije (približno 70. PDN). Nakon dodatnog fiksiranja in situ, mozak se uklanja, važe i obrađuje za neuropatološko vrednovanje.

13. Druga skupina od 20 životinja po spolu i po visini doze upotrebljava se za ispitivanje kognitivne funkcije u mladih odraslih životinja (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu). Od tih životinja 10 životinja po spolu i po skupini (odnosno 1 mužjak i 1 ženka po leglu) usmrćuju se na završetku studije, a mozak se odstranjuje i važe.

Tablica 3.

Br. mladunca ([a])		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
1	5	10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/ morfometrija na 11. PND
		10 m + 10 ž	Težina mozga na 11. PND
2	6	20 m + 20 ž	Bihevioralna ontogeneza (motorička aktivnost)
		20 m + 20 ž	Motorička aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolno sazrijevanje
		20 m + 20 ž	Učenje i pamćenje (27. PND)

▼**M5**

Br. mladunca [a]		Broj mladunaca raspoređenih za ispitivanje	Pregled/ispitivanje
m	ž		
3	7	20 m + 20 ž	Reakcija na buku (adolescentne i mlade odrasle životinje)
		20 m + 20 ž	Detaljna klinička opažanja
		10 m + 10 ž	Težina mozga/neuropatologija/morfometrija u mladih odraslih životinja ~ 70. PND
4	8	20 m + 20 ž	Učenje i pamćenje (mlade odrasle životinje)
		10 m + 10 ž	Težina mozga u mladih odraslih životinja

([a]) U ovom se primjeru legla sastoje od 4 mužjaka + 4 ženke; muški su mladunci označeni brojevima od 1 do 4, a ženke mladunci od 5 do 8.

▼**M5**

Dodatak 2.

Definicije

Kemikalija: Tvar ili smjesa

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom

▼M5

B.54. **UTEROTROPNI BIOTEST KOD GLODAVACA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA NA ESTROGENSKA SVOJSTVA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda istovjetna je Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 440 (2007.). OECD je 1998. godine pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora (1). Jedan je element aktivnosti bio razvoj smjernice za ispitivanje za uterotropni biotest u glodavaca. Uterotropni biotest u glodavaca tada je podvrgnut opsežnom programu validacije, uključujući sastavljanje detaljnog popratnog dokumenta (2) (3) te provođenje opsežnih studija unutar laboratorija i među njima, kako bi se pokazala važnost i obnovljivost biotesta s potentnim referentnim estrogenom, slabim agonistima receptora estrogena, jakim antagonistom receptora estrogena i negativnom referentnom kemikalijom (4) (5) (6) (7) (8) (9). Ova je ispitna metoda B.54. rezultat iskustva stečenog tijekom programa validacije ispitivanja i njegovih rezultata za estrogenske agoniste.

2. Uterotropni biotest kratkoročni je test probira nastao u 1930-ima (27) (28) te ga je stručni odbor prvi put standardizirao za probir 1962. (32) (35). On se temelji na povećanju mase maternice ili uterotropnoj reakciji (za recenziju vidjeti 29.). Njime se vrednuje sposobnost kemikalije da potakne biološke aktivnosti konzistentne agonistima i antagonistima prirodnih estrogena (npr. 17ß-estradiol). Međutim, njegova upotreba za utvrđivanje antagonista manje je uobičajena nego za utvrđivanje agonista. Maternica reagira na estrogene na dva načina. Početna je reakcija povećanje mase zbog zadržavanja vode. Ta je reakcija praćena porastom mase zbog rasta tkiva (30). Reakcije maternice u štakora i miševa kvalitativno su usporedive.

3. Ovaj biotest služi kao test probira in vivo, a njegova bi se primjena trebala promatrati u kontekstu „OECD-ovog konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (Dodatak 2.). U tom se konceptualnom okviru uterotropni biotest nalazi na 3. razini kao test in vivo koji pruža podatke o jedinstvenom endokrinom mehanizmu, odnosno estrogenizaciji.

4. Planira se uključivanje uterotropnog biotesta u bateriju testova in vitro i in vivo radi identifikacije kemikalija s potencijalom za interakciju s endokrinim sustavom, što na kraju dovodi do procjena rizika po ljudsko zdravlje i okoliš. U programu validacije OECD-a upotrebljavali su se jaki i slabi agonisti estrogena radi vrednovanja učinka testa pri identifikaciji estrogenskih kemikalija (4) (5) (6) (7) (8). Na taj je način, uz dobru obnovljivost unutar jednog laboratorija i između više njih, dobro predstavljena osjetljivost ispitnog postupka za agoniste estrogena.

5. Kad je riječ o negativnim spojevima, samo je jedna „negativna” referentna kemikalija, za koju su uterotropni test, kao i vezivanje receptora in vitro i testovi receptora, pokazali negativnu vrijednost, obuhvaćena programom validacije, ali su ocijenjeni dodatni podaci o ispitivanju koji nisu povezani s programom validacije OECD-a, čime je dodatno potkrijepljena specifičnost uterotropnog biotesta za probir agonista estrogena (16).

▼**M5**

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

6. Agonisti i antagonisti estrogena djeluju kao ligandi za receptore estrogena α i β te mogu aktivirati odnosno inhibirati transkripcijsko djelovanje receptora. To može dovesti do opasnosti po zdravlje, uključujući reproduktivne i razvojne učinke. Stoga postoji potreba za brzom procjenom i vrednovanjem kemikalije kao mogućeg agonista ili antagonista estrogena. Iako informativan, afinitet liganda za receptor estrogena ili transkripcijsku aktivaciju gena izvjestitelja in vitro samo je jedna od nekoliko odrednica moguće opasnosti. Ostale odrednice mogu uključivati metaboličku aktivaciju i deaktivaciju pri ulasku u tijelo, distribuciju u ciljna tkiva i uklanjanje iz tijela, barem djelomično ovisno o načinu primjene i kemikaliji koja se ispituje. To dovodi do potrebe za probirom mogućeg djelovanja kemikalije in vivo u odgovarajućim uvjetima, osim ako se odgovarajuće informacije već nalaze u karakteristikama kemikalije u pogledu apsorpcije – distribucije – metabolizma – eliminacije (ADME). Tkiva maternice na stimulaciju estrogenima odgovaraju brzim i snažnim rastom, posebno u laboratorijskih glodavaca u kojih ciklus estrusa traje približno 4 dana. Vrste glodavaca, osobito štakori, u širokoj su upotrebi i u studijama toksičnosti za karakterizaciju opasnosti. Zato je maternica glodavaca odgovarajući ciljni organ za probir in vivo agonista i antagonista estrogena.

7. Ova se metoda temelji na onim protokolima iz OECD-ove validacijske studije za koje je dokazano da su pouzdani i ponovljivi u studijama unutar laboratorija i između njih (5)(7). Trenutačno postoje dvije metode, odnosno metoda na odraslim ženkama kojima su odstranjeni jajnici te metoda na nezrelim životinjama kojima nisu odstranjeni jajnici. OECD-ovim programom validacije ispitivanja dokazano je da obje metode imaju usporedivu osjetljivost i obnovljivost. Međutim, metoda na nezrelim životinjama kojima nisu odstranjeni jajnici, s obzirom na to da imaju netaknutu os hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG), nešto je manje specifična, ali je njome obuhvaćen veći raspon ispitivanja u usporedbi s metodom na odraslim ženkama kojima su odstranjeni jajnici, zato što može reagirati na kemikalije koje djeluju na os HPG, a ne samo na receptor estrogena. Os HPG u štakora funkcionalna je na približno 15. dan starosti. Prije toga pubertet se ne može ubrzati tretmanima poput GnRH. Početkom ulaska u pubertet, prije otvaranja vagine, ženka će imati nekoliko tihih ciklusa čije posljedice neće biti otvaranje vagine ili ovulacija, ali će postojati hormonalne fluktuacije. Ako se kemikalijom izravno ili neizravno stimulira os HPG, posljedice će biti preuranjeni pubertet, rana ovulacija i ubrzano otvaranje vagine. Osim kemikalija koje djeluju na os HPG, stimulacija rasta i ubrzanje otvaranja vagine posljedice su nekih vrsta prehrane s višim razinama metabolizirajuće energije, bez estrogenskih obilježja. Takve kemikalije ne bi izazvale uterotropnu reakciju u odraslih životinja kojima su odstranjeni jajnici jer njihova os HPG ne funkcionira.

8. Radi dobrobiti životinja prednost bi trebalo dati metodi u kojoj se upotrebljavaju nezreli štakori, uključujući kiruršku pripremu životinja i izbjegavanje mogućeg neupotrebljavanja onih životinja koje pokazuju znakove ulaska u ciklus estrusa (vidjeti stavak 30.).

▼M5

9. Uterotropna reakcija nije posve estrogenskog podrijetla, odnosno kemikalije koje nisu agonisti ili antagonisti estrogena isto tako mogu uzrokovati reakciju. Primjerice, razmjerno visoke doze progesterona, testosterona ili različitih sintetičkih progestina mogu dovesti do stimulativne reakcije (30). Sve reakcije mogu se histološki analizirati u pogledu keratinizacije i kornifikacije vagine (30). Neovisno o mogućem podrijetlu reakcije, radnje radi daljnjeg pojašnjenja obično bi se trebale pokrenuti zbog pozitivnog ishoda uterotropnog biotesta. Dodatni dokazi estrogenizacije mogli bi se pronaći u testovima in vitro, poput testova vezivanja ER-a i testova transkripcijske aktivacije, ili u drugim testovima in vivo poput testa ženskog puberteta.

10. Uzimajući u obzir da se uterotropni biotest upotrebljava kao test probira in vivo, primijenjeni validacijski pristup bio je u funkciji dobrobiti životinja i stupnjevane strategije ispitivanja. U tu su svrhu napori bili usmjereni na strogu validaciju obnovljivosti i osjetljivosti za estrogenizaciju – glavni problem za brojne kemikalije, dok su skromni napori bili usmjereni na antiestrogenizacijsku sastavnicu testa. Ispitivan je samo jedan antiestrogen s jakim djelovanjem s obzirom na to da je broj kemikalija s jasnim antiestrogenskim profilom (koji ne ometa određeno estrogensko djelovanje) vrlo ograničen. Zato je ta ispitna metoda ograničena na estrogenski protokol, dok je protokol kojim se opisuje antagonistički način testa obuhvaćen Smjernicom (37). Obnovljivost i osjetljivost testa za kemikalije s isključivo antiestrogenskim djelovanjem bolje će se definirati kasnije, nakon što ispitni postupak bude u rutinskoj upotrebi neko vrijeme te nakon identifikacije više kemikalija ovim načinom djelovanja.

11. Potvrđuje se da će svi postupci koji se temelje na životinjama biti u skladu s lokalnim standardima brige za životinje; opisi brige i postupanja utvrđeni u nastavku minimalni su standardi učinka te će biti zamijenjeni lokalnim propisima poput Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja, koje se koriste u znanstvene svrhe (38). OECD daje daljnje smjernice za humano postupanje sa životinjama (25).

12. Kao i u svim testovima u kojima se upotrebljavaju žive životinje, prije početka testa ključno je osigurati da podaci doista budu nužni. Primjerice, u dvama uvjetima podaci mogu biti nužni:

— visok potencijal izloženosti (1. razina konceptualnog okvira, Dodatak 2.) ili indikacije za estrogenizaciju (2. razina), za ispitivanje mogu li takvi učinci nastati in vivo,

— učinci kojima se ukazuje na estrogenizaciju na 4. ili 5. razini testova in vivo radi dokazivanja da su učinci bili povezani s estrogenskim mehanizmom koji je nemoguće razjasniti pomoću testa in vivo.

13. Definicije upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

▼M5

NAČELO ISPITIVANJA

14. Osjetljivost uterotropnog biotesta oslanja se na sustav ispitivanja životinja u kojem os hipotalamus-hipofiza-jajnici nije funkcionalna, što dovodi do niskih endogenskih razina cirkulacije estrogena. Na taj će se način osigurati mala osnovna masa maternice i najveći raspon reakcije na primijenjene estrogene. Dva stanja osjetljivosti na estrogen u ženki glodavaca ispunjavaju ovaj uvjet:

i. nezrele ženke nakon odbijanja od sise i prije puberteta; te

ii. mlade odrasle ženke nakon odstranjivanja jajnika uz dovoljno vremena za vraćanje tkiva maternice.

15. Ispitivana kemikalija primjenjuje se svakodnevno oralnom sondom ili potkožnom injekcijom. Graduirane doze ispitivane kemikalije primjenjuju se na najmanje dvije skupine pokusnih životinja za tretiranje (za smjernice vidjeti stavak 33.), upotrebom jedne visine doze po skupini u razdoblju primjene od tri uzastopna dana za metodu nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici, odnosno razdoblju primjene od najmanje tri uzastopna dana za metodu odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici. Životinje se podvrgavaju nekropsiji približno 24 sata nakon posljednje doze. Za agoniste estrogena procjenjuje se srednja masa maternice tretiranih skupina životinja u odnosu na skupinu na kojoj se primjenjuje nosač radi statistički znatnog povećanja. Statistički znatno povećanje srednje mase maternice u ispitnoj skupini ukazuje na pozitivnu reakciju u ovom biotestu.

OPIS METODE

Odabir životinjskih vrsta

16. Mogu se upotrebljavati glodavci koji se obično upotrebljavaju u laboratorijima. Primjerice, sojevi štakora Sprague Dawley i Wistar upotrebljavani su tijekom validacije. Ne bi se trebali upotrebljavati sojevi za koje se zna ili pretpostavlja da imaju manje osjetljive maternice. Laboratorij bi trebao pokazati osjetljivost upotrebom soja prema opisu iz stavaka 26. i 27.

17. Štakor i miš rutinski se upotrebljavaju za uterotropni biotest od 1930-ih. OECD-ove validacijske studije provodile su se samo na štakorima, na temelju shvaćanja da se očekuje da su obje vrste istovjetne te bi zato jedna vrsta trebala biti dovoljna za validaciju širom svijeta kako bi se sačuvali resursi i životinje. Štakor je odabrana vrsta u većini studija reproduktivne i razvojne toksičnosti. Uzimajući u obzir postojanje velike historijske baze podataka za miševe, ograničena validacijska studija praćenja provedena je na miševima (16) kako bi se proširio raspon ispitne metode uterotropnog biotesta u glodavaca na upotrebu miševa kao ispitne vrste. U skladu s izvornom namjerom očuvanja resursa i životinja odabran je povezujući pristup s ograničenim brojem ispitivanih kemikalija, sudjelujućih laboratorija i bez kodiranog ispitivanja uzoraka. Tom povezujućom validacijskom studijom utvrđeno je da se, kad je riječ o uterotropnom biotestu na mladim odraslim miševima kojima su odstranjeni jajnici, podaci dobiveni za štakore i miševe u velikoj mjeri podudaraju. U slučajevima kad rezultati uterotropnog biotesta mogu prethoditi dugotrajnoj studiji, u obje se studije mogu upotrebljavati životinje istog soja i istog podrijetla. Povezujući pristup bio je ograničen na odrasle miševe kojima su odstranjeni jajnici pa izvješće ne pruža pouzdan skup podataka za validaciju modela nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici, zbog čega se taj model u miševa ne razmatra u okviru postojeće ispitne metode.

▼M5

18. Zato se u nekim slučajevima mogu upotrebljavati miševi umjesto štakora. Za tu bi vrstu trebalo navesti obrazloženje na temelju toksikoloških, farmakokinetičkih i/ili drugih kriterija. Za miševe bi mogle biti potrebne izmjene protokola. Primjerice, unos hrane u miševa na temelju tjelesne mase veći je nego u štakora te bi zato udjel fitoestrogena u hrani trebao biti niži u miševa nego u štakora (9) (20) (22).

Uvjeti smještaja i hranjenja

19. Svi bi postupci trebali biti u skladu s lokalnim standardima brige o laboratorijskim životinjama. Ti opisi brige i postupanja minimalni su standardi i zamijenit će se lokalnim propisima poput Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (38). Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi biti 22 °C (uz približan raspon od ± 3 °C). Relativna vlažnost trebala bi biti barem 30 %, a poželjno je da ne prelazi najviših 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Ciljna relativna vlažnost trebala bi biti od 50–60 %. Svjetlo bi trebalo biti umjetno. Dnevni redoslijed svjetla trebao bi biti 12 sati svjetla, 12 sati tame.

20. Laboratorijsku prehranu i vodu za piće trebalo bi osigurati ad libitum. Mlade odrasle životinje mogu se smjestiti pojedinačno ili u kaveze u skupinama do tri životinje. Zbog mladosti nezrelih životinja preporučuje se smještaj prema socijalnoj skupini.

21. Poznato je da visoke razine fitoestrogena u laboratorijskoj prehrani povećavaju masu maternice u glodavaca do stupnja koji je dostatan za ometanje uterotropnog biotesta (13) (14) (15). Visoke razine fitoestrogena i metabolizirajuće energije u laboratorijskoj prehrani mogu uzrokovati i preuranjeni pubertet ako se upotrebljavaju nezrele životinje. Prisutnost fitoestrogena ponajprije je posljedica uključivanja soje i alfalfa proizvoda u laboratorijsku prehranu, a dokazano je da koncentracije fitoestrogena variraju od serije do serije standardne laboratorijske prehrane (23). Tjelesna masa važna je varijabla s obzirom na to da je količina konzumirane hrane povezana s tjelesnom masom. Zato stvarne doze fitoestrogena koje se konzumiraju prema istoj prehrani mogu varirati između vrsta i prema dobi (9). U nezrelih ženki štakora unos hrane na temelju tjelesne mase može biti približno dvostruko veći od unosa mladih odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici. U mladih odraslih miševa unos hrane na temelju tjelesne mase može biti približno četverostruko veći od unosa mladih odraslih ženki štakora kojima su odstranjeni jajnici.

22. Međutim, rezultati uterotropnog testa (9) (17) (18) (19) ukazuju na to da su ograničene količine prehrambenih fitoestrogena prihvatljive te da se njima ne umanjuje osjetljivost biotesta. Primjerice, prehrambene razine fitoestrogena ne bi trebale premašiti 350 μg ekvivalenata genisteina po gramu laboratorijske prehrane u nezrelih ženki štakora sojeva Sprague Dawley i Wistar (6) (9). Takva bi se prehrana trebala primijeniti i pri ispitivanju mladih odraslih štakora kojima su odstranjeni jajnici jer je unos hrane na temelju tjelesne mase manji u mlade odrasle životinje nego u nezrelih životinja. Ako treba upotrebljavati miševe kojima su odstranjeni jajnici ili štakore koji su osjetljiviji na fitoestrogen, potrebno je razmotriti razmjerno smanjenje razina prehrambenog fitoestrogena (20). Osim toga, razlike u raspoloživoj metaboličkoj energiji iz različitih vrsta prehrane mogu dovesti do vremenskih pomaka za početak puberteta (21) (22).

▼M5

23. Prije studije potreban je pažljiv odabir prehrane bez povišene razine fitoestrogena (za primjer vidjeti (6) (9)) ili metabolizirajuće energije, koji mogu poremetiti rezultate (15) (17) (19) (22) (36). Važna je provjera oba navedena čimbenika osiguranje pravilnog funkcioniranja ispitnog sustava koji laboratorij upotrebljava kako je predviđeno stavcima 26. i 27. Kao zaštitu u skladu s dobrom laboratorijskom praksom potrebno je provesti reprezentativno uzorkovanje svake serije prehrane koja se primjenjuje tijekom studije radi moguće analize udjela fitoestrogena (npr. u slučaju velike kontrolne mase maternice u odnosu na historijske kontrole ili neodgovarajuće reakcije na referentni estrogen, 17 alfa-etinilestradiol). Alikvote treba analizirati kao dio studije ili zamrznuti na – 20 °C, odnosno tako da se spriječi propadanje uzorka prije analize.

24. Neke vrste stelje mogu sadržavati prirodne estrogenske ili antiestrogenske kemikalije (npr. poznato je da klip kukuruza utječe na ciklus štakora pa se čini da je antiestrogenski). Odabrana stelja trebala bi sadržavati minimalnu razinu fitoestrogena.

Priprema životinja

25. Pokusne životinje bez utvrđenih bolesti ili fizičkih abnormalnosti nasumično se raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Kaveze treba urediti tako da se eventualni učinci držanja u kavezu svedu na minimum. Životinje treba označiti jedinstvenim oznakama. Poželjno je nezrele životinje smjestiti u kaveze sa ženkama ili zamjenskim ženkama do odbijanja od sise tijekom aklimatizacije. Razdoblje aklimatizacije prije početka studije trebalo bi trajati približno 5 dana za mlade odrasle životinje te za nezrele životinje isporučene sa ženkama ili zamjenskim ženkama. Ako se nezrele životinje nabavljaju kao životinje upravo odbijene od sise bez ženki, kraće razdoblje aklimatizacije može biti potrebno jer bi doziranje trebalo započeti neposredno nakon odbijanja od sise (vidjeti stavak 29.).

POSTUPAK

Provjera osposobljenosti laboratorija

26. Za provjeru osposobljenosti laboratorija mogu se upotrebljavati dvije različite mogućnosti:

— periodična provjera koja se temelji na početnoj studiji osnovne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 27.). Najmanje svakih 6 mjeseci i u slučaju svake promjene koja može utjecati na provođenje testa (npr. nova formulacija prehrane, promjena osoblja koje obavlja disekcije, promjene soja životinja ili dobavljača itd.) treba provjeriti reakciju ispitnog sustava (životinjski model) pomoću odgovarajuće doze (na temelju studije osnovne pozitivne kontrole iz stavka 27.) referentnog estrogena 17α-etinilestradiola (CAS br. 57-63-6) (EE),

— upotreba usporednih kontrola uključivanjem u svaki test skupine kojoj se daje odgovarajuća doza referentnog estrogena.

Ako sustav ne reagira prema očekivanjima, eksperimentalne uvjete treba ispitati i izmijeniti prema potrebi. Preporučuje se da doza referentnog estrogena koju treba upotrijebiti u bilo kojem pristupu bude približno ED70 do 80.

▼M5

27. Studija osnovne pozitivne kontrole – prije nego što laboratorij prvi put provodi studiju na temelju ove ispitne metode, potrebno je dokazati njegovu osposobljenost ispitivanjem reakcije životinjskog modela utvrđivanjem doze reakcije referentnog estrogena 17α-etinilestradiola (CAS br. 57-63-6) (EE) pomoću najmanje četiri doze. Reakcija mase maternice usporedit će se s utvrđenim povijesnim podacima (vidjeti referencu (5)). Ako se pomoću studije osnovne pozitivne kontrole ne dobiju očekivani rezultati, potrebno je ispitati i izmijeniti eksperimentalne uvjete.

Broj i stanje životinja

28. Sve skupine za tretiranje i kontrolne skupine trebale bi se sastojati od najmanje šest životinja (u protokolu za metodu nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici i metodu odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici).

Dob nezrelih životinja

29. U uterotropnim testovima na nezrelim životinjama potrebno je odrediti dan okota. S doziranjem treba započeti dovoljno rano kako bi se osiguralo da po završetku primjene kemikalije još nije došlo do fiziološkog povećanja endogenih estrogena povezanih s pubertetom. S druge strane, postoje dokazi da vrlo mlade životinje mogu biti manje osjetljive. U definiranju optimalne dobi svaki bi laboratorij trebao uzeti u obzir vlastite podatke o sazrijevanju.

Opće je pravilo da se s doziranjem u štakora može započeti neposredno nakon ranog odbijanja od sise na 18. postnatalni dan (pri čemu je dan okota nulti postnatalni dan). Doziranje u štakora treba okončati na 21. postnatalni dan, a svakako prije 25. postnatalnog dana zato što nakon te dobi os hipotalamus-hipofiza-jajnici postaje funkcionalna, a razine endogenih estrogena mogu početi rasti uz istodobno povećanje osnovne srednje mase maternice te standardnih devijacija skupine (2) (3) (10) (11) (12).

Postupak odstranjivanja jajnika

30. U ženki štakora i miševa kojima su odstranjeni jajnici (skupine za tretiranje i kontrolne skupine) odstranjivanje jajnika trebalo bi obaviti između šestog i osmog tjedna života. Štakorima je potrebno najmanje 14 dana između odstranjivanja jajnika i prvog dana primjene kako bi se maternica vratila na minimalnu, stabilnu osnovu. Miševima je potrebno najmanje sedam dana između odstranjivanja jajnika i prvog dana primjene. S obzirom na to da su male količine tkiva jajnika dovoljne za proizvodnju znatnih cirkulirajućih razina estrogena (3), životinje bi trebalo ispitati prije upotrebe promatranjem vaginalnih stanica epitela najmanje pet uzastopnih dana (npr. od 10. do 14. dana od odstranjivanja jajnika u štakora). Ako se kod njih uoče bilo kakvi dokazi ulaska u ciklus estrusa, životinje ne bi trebalo upotrebljavati. Osim toga, pri nekropsiji treba pregledati ostatke jajnika radi dokaza o prisutnosti tkiva jajnika. U tom slučaju životinju ne bi trebalo upotrebljavati u izračunima (3).

31. Postupak odstranjivanja jajnika započinje kad je životinja u ventralnom položaju nakon što je odgovarajuće anesterizirana. Rez kojim se otvara dorsolateralni trbušni zid trebao bi se nalaziti približno 1 cm uzdužno od središnje točke između kostalnog ruba rebara i zdjelične kosti te nekoliko milimetara lateralno od lateralnog ruba lumbalnog mišića. Jajnik treba odstraniti iz trbušne šupljine na aseptičnu podlogu. Jajnik treba odvojiti na spoju jajovoda i tijela maternice. Nakon potvrde da nema opsežnog krvarenja, trbušni zid treba zatvoriti šavom, a kožu kopčama ili odgovarajućim šavom. Točke podvezivanja shematski su prikazane na slici 1. Potrebno je upotrebljavati odgovarajuće postoperativne analgetike prema preporuci veterinara s iskustvom u njezi glodavaca.

▼M5

Tjelesna masa

32. U metodi odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici, tjelesna masa i masa maternice nisu povezane zato što na masu maternice utječu hormoni poput estrogena, a ne čimbenici rasta kojima se regulira tjelesna masa. Međutim, tjelesna masa povezana je s masom maternice tijekom sazrijevanja kod modela nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici (34). Zato na početku studije variranje tjelesne mase životinja koje se upotrebljavaju u modelu nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici treba biti što manje i ne bi trebalo premašiti ± 20 % srednje vrijednosti mase. To znači da bi uzgajivač trebao standardizirati veličinu legla kako bi osigurao da će se potomci različitih životinja majki približno jednako hraniti. Životinje bi trebalo rasporediti u skupine (kontrolne skupine i skupine za tretman) prema slučajnoj distribuciji mase, tako da se srednja tjelesna masa svake skupine statistički ne razlikuje od ostalih skupina. Trebalo bi po mogućnosti izbjegavati raspodjelu članova istog legla u istu skupinu za tretiranje bez povećavanja broja leglā koje treba upotrebljavati za ispitivanje.

Doziranje

33. Kako bi se utvrdilo može li ispitna kemikalija imati estrogensko djelovanje in vivo, obično su dovoljne dvije skupine kojima se daje određena doza pa je zato taj dizajn poželjan radi dobrobiti životinja. Ako je svrha dobiti krivulju doza reakcija ili ekstrapolirati niže doze, potrebne su barem tri skupine kojima se daje određena doza. Ako je potrebno više informacija osim estrogenske aktivnosti (poput procjene potencije), treba razmotriti drukčiji režim doziranja. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u ispitnoj skupini. Ako se u primjeni ispitivane kemikalije upotrebljava nosač, kontrolna skupina trebala bi primiti jednaku količinu nosača kao i tretirane skupine (ili najveći volumen koji je primijenjen na ispitne skupine ako se on razlikuje među skupinama).

34. Cilj je u slučaju uterotropnog biotesta odabrati doze kojima se osigurava preživljavanje životinja te koje nisu znatno toksične i opasne za životinje nakon tri uzastopna dana primjene kemikalije do najveće doze od 1 000 mg/kg/d. Sve visine doza treba predložiti i odabrati uzimajući u obzir sve raspoložive podatke o toksičkim i (toksiko-) kinetičkim svojstvima ispitivane kemikalije ili srodnih materijala. Najvišom dozom prvo bi trebalo uzeti u obzir LD50 i/ili informacije o akutnoj toksičnosti kako bi se izbjegla smrt, teška patnja ili opasnost za životinje (24) (25) (26). Najviša bi doza trebala predstavljati maksimalnu dozu tolerancije (MDT), a prihvatljiva bi bila i studija provedena na visini doze kojom je izazvana pozitivna uterotropna reakcija. Veliki intervali (npr. polovične log jedinice odgovaraju progresiji doze od 3,2 ili čak i više do cjelovitih log jedinica) između doziranja općenito su prihvatljivi u svrhu probira. Ako nema odgovarajućih podataka, može se provesti studija utvrđivanja količinskog raspona kako bi se lakše utvrdile doze koje treba primjenjivati.

35. U suprotnom, ako se estrogenski potencijal agonista može procijeniti prema podacima in vitro (ili in silico), oni se mogu uzeti u obzir pri odabiru doze. Primjerice, količina ispitivane kemikalije koja bi potaknula uterotropne reakcije jednakovrijedne referentnom agonistu (etinilestradiol) procjenjuje se prema njegovim potencijalima in vitro u odnosu na etinilestradiol. Najviša ispitna doza dobila bi se množenjem te jednakovrijedne doze s odgovarajućim faktorom, npr. 10 ili 100.

▼M5

Razmatranja za utvrđivanje količinskog raspona

36. Preliminarna studija utvrđivanja količinskog raspona može se, prema potrebi, provesti na nekoliko životinja. U tom pogledu može se upotrijebiti OECD-ova Smjernica br. 19 (25) kojom su definirani klinički znakovi toksičnosti ili opasnosti za životinje. Ako je tijekom te studije utvrđivanja količinskog raspona nakon tri dana primjene to moguće, maternice se mogu odstraniti i izvagati približno 24 sata nakon posljednje doze. Ti bi se podaci potom mogli upotrebljavati u dizajnu glavne studije (za odabir prihvatljivih najviših i nižih doza te preporuku broja skupina za doziranje).

Primjena doza

37. Ispitivana kemikalija primjenjuje se oralnom sondom ili potkožnom injekcijom. Pri odabiru primjene u obzir treba uzeti dobrobit životinja, kao i toksikološke aspekte poput važnosti načina na koji su ljudi izloženi kemikaliji (npr. oralne sonde za gutanje, potkožne injekcije za udisanje ili dermalnu apsorpciju), fizička/kemijska svojstva ispitnog materijala, osobito postojećih toksikoloških informacija i podataka o metabolizmu i kinetici (npr. potreba za izbjegavanjem metabolizma prvog prolaska, bolja učinkovitost određenim načinom primjene).

38. Preporuka je da se, kad god je to moguće, najprije razmotri mogućnost upotrebe vodene otopine/suspenzije. Ali s obzirom na to da je većina liganada estrogena ili njihovih metaboličkih prekursora hidrofobna, najčešći je pristup upotreba uljne otopine/suspenzije (npr. ulje kukuruza, kikirikija, sezama ili masline). Međutim, ta ulja imaju različite udjele kalorija i masti, zbog čega bi nosač mogao utjecati na unos ukupne metabolizirajuće energije (ME), čime bi se mogle izmijeniti izmjerene krajnje točke poput mase maternice, osobito kod metode nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici (33). Zato prije studije treba ispitati sve nosače koje treba upotrebljavati uusporedbi s kontrolama bez nosača. Ispitivana kemikalija može se otopiti u minimalnoj količini 95 %-tnog etanola ili drugih odgovarajućih otapala te razrijediti do konačne radne koncentracije u ispitivanom nosaču. Toksične karakteristike otapala moraju biti poznate te bi ih trebalo ispitivati u zasebnoj kontrolnoj skupini samo za otapalo. Ako se ispitivana kemikalija smatra stabilnom, pri njezinom otapanju mogu se upotrebljavati blago zagrijavanje i žustro mehaničko djelovanje. Trebalo bi utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije u nosaču. Ako je ispitivana kemikalija stabilna tijekom trajanja studije, tada se može pripremiti jedan početni alikvot ispitivane kemikalije, a utvrđene razrijeđene doze pripremaju se svakodnevno.

39. Tempiranje doziranja ovisit će o upotrijebljenom modelu (vidjeti stavak 29. za model nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici i stavak 30. za model odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici). Nezrelim ženkama štakora ispitivana kemikalija dozira se svakodnevno tri uzastopna dana. Za ženke štakora kojima su odstranjeni jajnici jednako se tako preporučuje trodnevni tretman, ali uz prihvatljiva dulja izlaganja kojima se može poboljšati otkrivanje kemikalija sa slabim učinkom. Ženkama miševa kojima su odstranjeni jajnici trodnevna primjena trebala bi biti dovoljna bez znatnog utjecaja produljenja do sedam dana za jake agoniste estrogena. Međutim, takav odnos nije dokazan u validacijskoj studiji za slabe estrogene (16) pa bi doziranje trebalo produljiti do sedam uzastopnih dana u odraslih miševa kojima su odstranjeni jajnici. Doza bi se trebala davati svakog dana u isto vrijeme. Doze bi trebalo prilagoditi prema potrebi, kako bi se održala stalna visina doze u smislu tjelesne mase životinja (npr. mg ispitivane kemikalije po kg tjelesne mase po danu). Kad je riječ o ispitnom volumenu, njegovu varijabilnost na temelju tjelesne mase trebalo bi umanjiti prilagođavanjem koncentracije otopine za doziranje kako bi se osigurao stalni volumen na temelju tjelesne mase na svim visinama doze i za svaki način primjene.

▼M5

40. U slučaju primjene oralnom intubacijom, ispitivanu kemikaliju treba primijeniti kao jednu dnevnu dozu pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Maksimalan volumen tekućine koji se može primijeniti odjednom ovisi o veličini pokusne životinje. Treba slijediti lokalne smjernice o brizi za životinje, ali volumen ne bi trebao premašivati 5 ml/kg tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina, kada se može upotrijebiti 10 ml/kg tjelesne mase.

41. Ako se ispitivana kemikalija primjenjuje potkožnom injekcijom, to treba učiniti u jednoj dnevnoj dozi. Doze bi se trebale primjenjivati u dorzalno-skapularnim ili lumbalnim predjelima sterilnom iglom (npr. veličine 23 ili 25) ili tuberkulinskom špricom. Brijanje mjesta uboda nije obvezno. Treba zabilježiti sve gubitke, curenja na mjestu uboda ili nepotpuno doziranje. Ukupni injektirani volumen po štakoru po danu ne bi trebao premašivati 5 ml/kg tjelesne mase, raspoređeno na dva mjesta uboda, osim u slučaju vodenih otopina, kada se može upotrijebiti 10 ml/kg tjelesne mase.

Opažanja

Opća i klinička opažanja

42. Opća klinička opažanja treba provoditi barem jednom dnevno ili češće ako se uoče znakovi toksičnosti. Poželjno je opažanja provoditi svakodnevno u isto(-a) doba te uzimajući u obzir razdoblje očekivanih vršnih učinaka nakon doziranja. Sve životinje trebalo bi promatrati radi znakova smrti i bolesti te općih kliničkih znakova poput promjena u ponašanju, na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojave iscjedaka i izlučevina te autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija, piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju).

Tjelesna masa i unos hrane

43. Sve životinje treba svakodnevno vagati do najbližeg 0,1 g, počevši neposredno prije početka tretmana, odnosno kad su životinje raspoređene po skupinama. Dodatno se može izmjeriti i količina hrane unesene tijekom razdoblja tretmana po kavezu vaganjem posuda za hranu. Rezultate o unosu hrane treba izraziti u gramima po štakoru po danu.

Disekcija i vaganje maternice

44. Štakori će se humano usmrtiti dvadeset i četiri sata nakon posljednjeg tretmana. U idealnim uvjetima redoslijed nekropsije bit će nasumičan prema skupinama kako bi se izbjegla progresija izravno prema gore ili dolje u skupinama za doziranje koja bi mogla suptilno utjecati na podatke. Cilj je biotesta izvagati mokru maternicu i maternicu kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem. Masa mokre maternice uključuje maternicu i udjel luminalne tekućine. Masa maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem mjeri se nakon izražavanja i uklanjanja luminalnog udjela maternice.

45. Vagina će se prije disekcije pregledati radi stanja otvorenosti u nezrelih životinja. Postupak disekcije započinje otvaranjem abdominalnog zida na spoju zdjeličnih kostiju. Potom se rog maternice i jajnici, ako postoje, odvajaju od dorsalnog abdominalnog zida. Mokraćni mjehur i mokraćovodi uklanjaju se s ventralne i lateralne strane maternice i vagine. Fibrozna adhezija između rektuma i vagine odvaja se do spoja vaginalnog otvora i može se uočiti koža potrbušnice. Maternica i vagina odvajaju se od tijela incizijom

▼M5

vaginalnog zida neposredno iznad spoja kože potrbušnice kako je prikazano na slici 2. Maternicu treba odvojiti od tjelesnog zida nježnim rezanjem materničnog mezenterija u točki spajanja duž cijele duljine dorsolateralnog aspekta svakog roga maternice. Nakon odstranjivanja iz tijela rukovanje maternicom treba biti dovoljno brzo radi izbjegavanja sušenja tkiva. Gubitak mase zbog isušivanja postaje važniji za mala tkiva poput materničnih (23). Ako postoje, jajnici se uklanjaju kod jajovoda, izbjegavajući gubitak luminalne tekućine iz roga maternice. Ako su životinji odstranjeni jajnici, ostatke jajnika treba pregledati radi prisutnosti bilo kakvog tkiva jajnika. Višak masnog i vezivnog tkiva treba obrezati. Vagina se uklanja iz maternice neposredno ispod cerviksa tako da on ostane na tijelu maternice kako je prikazano na slici 2.

46. Svaku maternicu treba smjestiti u spremnik koji je jedinstveno označen i izvagan (npr. u Petrijevu zdjelicu ili plastičnu posudu za vaganje) uz stalnu pažnju radi izbjegavanja sušenja prije vaganja (npr. u spremnik se može staviti filtarski papir blago navlažen fiziološkom otopinom). Maternicu s luminalnom tekućinom izvagat će se do najbližeg 0,1 mg (masa mokre maternice).

47. Svaku će se maternicu potom pojedinačno obrađivati kako bi se uklonila luminalna tekućina. Oba će se roga maternice probušiti i poprečno prerezati. Maternica će se smjestiti na blago navlaženi filtarski papir (npr. Whatman br. 3) i nježno pritisnuti drugim komadom blago navlaženog filtarskog papira kako bi se luminalna tekućina u potpunosti uklonila. Maternica bez luminalnog udjela izvagat će se do najbližeg 0,1 mg (masa maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem).

48. Masa maternice na završetku studije može se upotrebljavati kako bi se osiguralo da odgovarajuća dob nezrelih netaknutih štakora ne bude premašena. Međutim, u tom su pogledu odlučujući povijesni podaci soja štakora koji laboratorij upotrebljava (vidjeti stavak 56. za tumačenje rezultata).

Neobvezna ispitivanja

49. Nakon vaganja maternicu se može fiksirati u 10 %-tnom neutralnom puferiranom formalinu radi histolopatološkog pregleda nakon bojanja hematoksilinom i eosinom (HE). I vaginu se može ispitati na taj način (vidjeti stavak 9.). Osim toga, morfometrijsko mjerenje endometrijskog epitela može se obaviti radi količinske usporedbe.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

50. Podaci o studiji trebali bi uključivati:

— broj životinja na početku testa,

— broj i identitet životinja koje su uginule tijekom testa ili su iz humanih razloga usmrćene te datum i vrijeme smrti ili humanog usmrćivanja,

— broj i identitet životinja u kojih su uočeni znakovi toksičnosti te opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme početka, trajanje i težinu svih toksičnih učinaka, te

— broj i identitet životinja pri kojima su uočene lezije te opis vrste lezija.

▼**M5**

51. Podatke o pojedinačnim životinjama treba zabilježiti u slučaju tjelesne mase, mase mokre maternice i mase maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem. Za utvrđivanje je li statistički znatno povećanje ($p < 0,05$) mase maternice posljedica primjene ispitivane kemikalije treba upotrebljavati jednostrane statističke analize. Treba provesti odgovarajuće statističke analize kako bi se ispitale promjene povezane s tretmanom mase maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem i mase mokre maternice. Primjerice, podaci se mogu vrednovati pomoću analize pristupa kovarijance (ANCOVA) s tjelesnom masom pri nekropsiji kao kovarijablom. Logaritamska transformacija stabiliziranja varijance podataka o maternici može se obaviti prije analize podataka. Test Dunnetta i Hsua primjeren je za usporedbu parova svake skupine za doziranje s kontrolama nosača te za izračun intervala pouzdanosti. Grafovi studentiziranih ostataka mogu se upotrebljavati za otkrivanje mogućih ekstremnih vrijednosti te za procjenu homogenosti varijanci. Ti su se postupci primjenjivali u validacijskom programu OECD-a upotrebom PROC GLM-a u sustavu za statističku analizu (Institut SAS, Cary, NC), verzija 8 (6) (7).

52. Završno izvješće uključuje:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje

— odgovorne osobe i njihove odgovornosti tijekom studije,

— podatke iz testa osnovne pozitivne kontrole i podatke o periodičkoj pozitivnoj kontroli (vidjeti stavke 26. i 27.).

Ispitivana kemikalija

— karakterizaciju ispitivane kemikalije,

— fizikalno stanje i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva,

— metodu i učestalost pripreme otopina,

— sve podatke o stabilnosti,

— sve analize otopina za doziranje.

Nosač

— karakterizaciju ispitnog nosača (stanje, dobavljač i serija),

— obrazloženje odabira nosača (ako nije riječ o vodi).

Ispitne životinje

— vrste i soj te obrazloženje njihova odabira,

— dobavljača i njegov posebni objekt,

— dob u trenutku isporuke i datum okota,

— za nezrele životinje, podatak jesu li isporučene sa ženkom ili nadomjesnom ženkom i datum odbijanja od sise,

— pojedinosti o postupku aklimatizacije životinja,

— broj životinja po kavezu,

— pojedinost i metodu identifikacije pojedinačne životinje i skupine.

Uvjeti testa

— pojedinosti o postupku nasumičnog odabira, odnosno upotrijebljenoj metodi,

— podloge za odabir visine doze,

▼M5

— pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije, njezinim ostvarenim koncentracijama, stabilnosti i homogenosti,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije i podloge za odabir puta izlaganja,

— prehranu (naziv, vrsta, dobavljač, sastav i razine fitoestrogena ako su poznate),

— izvor vode (npr. voda iz slavine ili filtrirana voda) te opskrba (cjevčicom iz većeg spremnika, u bocama itd.),

— podatke o stelji (naziv, vrsta, dobavljač, sastav),

— evidenciju o uvjetima smještaja u kavezima, svjetlosnom intervalu, temperaturi prostorije i vlazi, čišćenju prostorije,

— detaljan opis postupaka nekropsije i vaganja maternice,

— opis statističkih postupaka.

Rezultati

Za pojedinačne životinje:

— sve dnevne pojedinačne tjelesne mase (od raspodjele u skupine do nekropsije) (do najbližeg 0,1 g),

— dob svake životinje (u danima, počevši od dana okota kao nultog dana) na početku primjene ispitivane kemikalije,

— datum i vrijeme svake primjene doze,

— izračunani volumen i primjenu doziranja te opažanja o svim gubicima u doziranju tijekom ili nakon primjene,

— dnevnu evidenciju stanja životinje, uključujući relevantne simptome i opažanja,

— uzrok smrti na koji se sumnja (ako je tijekom studije životinja bila pred uginućem ili je uginula),

— datum i vrijeme humanog usmrćivanja s vremenskim intervalom do zadnjeg doziranja,

— masu mokre maternice (do najbližeg 0,1 mg) i sva opažanja gubitaka luminalne tekućine tijekom disekcije i pripreme za vaganje,

— masu maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem (do najbližeg 0,1 mg).

Za svaku skupinu životinja:

— srednje dnevne tjelesne mase (do najbližeg 0,1 g) i standardna odstupanja (od raspodjele u skupine do nekropsije),

— srednje mase mokre maternice i maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem (do najbližeg 0,1 g) i standardna odstupanja,

— dnevni unos hrane (izražen u gramima unesene hrane po životinji), ako se mjeri,

▼M5

— rezultate statističkih analiza kojima se uspoređuju mase mokre maternice i maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem tretiranih skupina u odnosu na iste vrijednosti kontrolnih skupina nosača,

— rezultate statističke analize kojom se uspoređuju ukupna tjelesna masa i porast tjelesne mase tretiranih skupina u odnosu na iste vrijednosti kontrolnih skupina nosača.

53. Sažetak važnih smjernica ispitne metode

	Štakori	Miševi
Životinje		
Soj	Soj laboratorijskih glodavaca koji se obično upotrebljava	
Broj životinja	Najmanje 6 životinja po skupini za doziranje	
Broj skupina	Najmanje 2 ispitne skupine (za primjer vidjeti stavak 33.) i negativna kontrolna skupina Za primjer pozitivnih kontrolnih skupina vidjeti stavke 26. i 27.	
Uvjeti smještaja i hranjenja		
T^o u prostoriji za životinje	22 °C ± 3 °C	
Relativna vlažnost	50–60 % i ne ispod 30 % ili iznad 70 %	
Dnevni redoslijed svjetla	12 sati svjetla, 12 sati tame	
Prehrana i voda za piće	Ad libitum	
Smještaj	Pojedinačno ili u skupinama do tri životinje (za nezrele životinje preporučuje se smještaj prema socijalnoj skupini)	
Prehrana i stelja	Preporučena niska razina fitoestrogena u prehrani i stelji	
Protokol		
Metoda	Metoda nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici (poželjna) Metoda odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici	Metoda odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici
Dob doziranja za nezrele životinje	Najranije 18. postnatalni dan. Doziranje treba dovršiti prije 25. postnatalnog dana	Nije relevantno u području primjene trenutačne ispitne metode
Dob za odstranjivanje jajnika	Između 6. i 8. tjedna starosti.	
Dob doziranja za životinje kojima su odstranjeni jajnici	Treba proći najmanje 14 dana između odstranjivanja jajnika i prvog dana primjene.	Treba proći najmanje 7 dana između odstranjivanja jajnika i prvog dana primjene
Tjelesna masa	Variranje tjelesne mase treba biti minimalno i ne smije premašivati ± 20 % srednje mase.	

▼M5

	Štakori	Miševi
Doziranje		
Put primjene	Oralna sonda ili potkožna injekcija	
Učestalost primjene	Jedna dnevna doza	
Volumen za sondu ili injekciju	≤ 5ml/kg tjelesne mase (ili do 10 ml/kg tjelesne mase u slučaju vodenih otopina) (na dva mjesta uboda pri potkožnom putu)	
Trajanje primjene	3 uzastopna dana u modelu nezrelih životinja kojima nisu odstranjeni jajnici Najmanje 3 uzastopna dana u modelu odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici	7 uzastopnih dana u modelu odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici
Vrijeme nekropsije	Približno 24 sata nakon posljednje doze	
Rezultati		
Pozitivna reakcija	Statistički znatno povećanje srednje mase maternice (mokre i/ili one kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem)	
Referentni estrogen	17α-etinilestradiol	

SMJERNICE ZA TUMAČENJE I PRIHVAĆANJE REZULTATA

54. Općenito, test estrogenizacije treba smatrati pozitivnim ako postoji statistički znatno povećanje mase maternice ($p < 0,05$), barem kod visoke doze u usporedbi s kontrolnom skupinom za otapalo. Pozitivan rezultat dodatno je potkrijepljen demonstracijom biološki vjerojatnog odnosa između doze i opsega reakcije, imajući u vidu da preklapajuća estrogenska i antiestrogenska djelovanja ispitivane kemikalije mogu utjecati na oblik krivulje doza – reakcija.

55. Potrebno je paziti da se ne premaši maksimalna doza tolerancije kako bi se omogućilo smisleno tumačenje podataka. U tom pogledu treba pomno procijeniti smanjenje tjelesne mase, kliničke znakove i ostale nalaze.

56. Mase maternice kontrolne skupine nosača važne su za prihvaćanje podataka uterotropnog biotesta. Visoke kontrolne vrijednosti mogu narušiti reakciju biotesta i sposobnost otkrivanja vrlo slabih agonista estrogena. U recenzijama literature i podacima dobivenim tijekom validacije uterotropnog biotesta ukazuje se na to da slučajevi srednjih vrijednosti visoke kontrole nastaju spontano, posebno u nezrelih životinja (2) (3) (6) (9). S obzirom na to da masa maternice nezrelih štakora ovisi o brojnim varijablama poput soja ili tjelesne mase, ne može se navesti krajnja gornja granica mase maternice. Primjerice, ako mase maternica kojima je višak tekućine uklonjen upijanjem iznose između 40 i 45 mg, rezultate treba smatrati sumnjivima, a zbog vrijednosti iznad 45 mg test se može ponoviti. Međutim, to treba razmotriti od slučaja do slučaja (3) (6) (8). Pri ispitivanju na odraslim štakorima zbog nepotpunog odstranjivanja jajnika ostat će tkivo jajnika koje može proizvoditi endogeni estrogen te usporiti regresiju mase maternice.

▼M5

57. Čini se da kontrola nosača maternice kojoj je višak tekućine uklonjen upijanjem manja od 0,09 % tjelesne mase u nezrelih štakora i manja od 0,04 % u mladih odraslih ženki kojima su odstranjeni jajnici daju prihvatljive rezultate (vidjeti tablicu 31. (2)). Ako su kontrolne mase maternice veće od navedenih vrijednosti, treba ispitati razne faktore, uključujući dob životinja, pravilno odstranjivanje jajnika, prehrambene fitoestrogene itd. te oprezno upotrebljavati negativan rezultat testa (bez indikacije estrogenskog djelovanja).

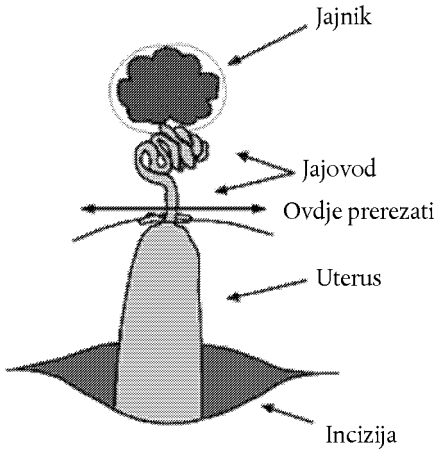
58. Povijesne podatke za kontrolne skupine nosača treba držati u laboratoriju. Povijesne podatke za reakcije na pozitivne referentne estrogene, poput 17α-etinilestradiola, jednako tako treba držati u laboratoriju. U laboratorijima se jednako tako može ispitivati reakcija na poznate slabe agoniste estrogena. Svi se ti podaci mogu usporediti s dostupnim podacima (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) kako bi se osigurala dovoljna osjetljivost laboratorijskih metoda.

59. Tijekom OECD-ove validacijske studije u masa maternica kojima je višak tekućine uklonjen upijanjem uočeno je manje varijabilnosti nego u masa mokrih maternica (6)(7). Međutim, znatna reakcija bilo koje vrijednosti ukazivala bi na to da je ispitivana kemikalija pozitivna na estrogensko djelovanje.

60. Uterotropna reakcija nije u potpunosti estrogenskog podrijetla. Međutim, pozitivan rezultat uterotropnog biotesta općenito treba tumačiti kao dokaz estrogenskog potencijala in vivo, zbog čega obično treba pokrenuti radnje radi daljnjih pojašnjenja (vidjeti stavak 9. i „OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija”, Prilog 2.).

Slika 1.

Shematski dijagram kirurškog odstranjivanja jajnika



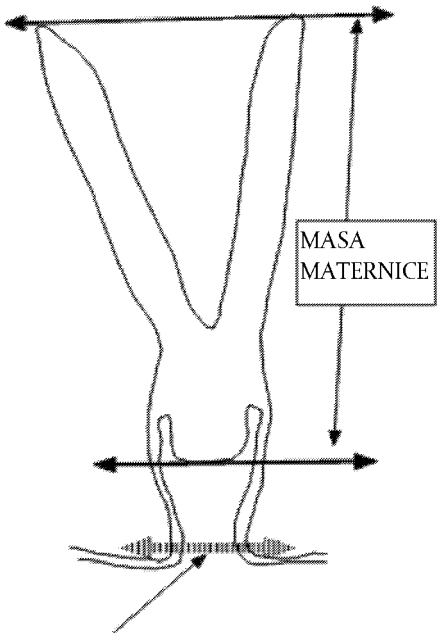
Mezometrij, vaskulatura i masni jastučić nisu prikazani

Postupak počinje otvaranjem dorsolateralnog trbušnog zida u središnjoj točki između kostalnog ruba rebara i zdjelične kosti te nekoliko milimetara lateralno od lateralnog ruba lumbalnog mišića. Treba utvrditi položaj jajnika u trbušnoj šupljini. Potom se jajnici na aseptičnoj podlozi fizički odvajaju od trbušne šupljine, između jajnika i maternice veže se konac radi kontrole krvarenja te se jajnik odvaja incizijom iznad konca na spoju jajovoda i svakog roga maternice. Nakon potvrde da nema znatnog krvarenja, trbušni zid treba zatvoriti šavom, a kožu kopčama ili odgovarajućim šavom. Životinjama treba omogućiti oporavak najmanje 14 dana prije upotrebe kako bi se masa maternice vratila.

▼**M5**

Slika 2.

Odstranjivanje i priprema tkiva maternice za vaganje.



Postupak započinje otvaranjem abdominalnog zida na spoju zdjeličnih kostiju. Potom se svaki jajnik, ako postoji, i rog maternice odvajaju od dorsalnog abdominalnog zida. Mokraćni mjehur i mokraćovodi uklanjaju se s ventralne i lateralne strane maternice i vagine. Fibrozna adhezija između rektuma i vagine odvaja se do spoja vaginalnog otvora te se može uočiti koža potrbušnice. Maternica i vagina odvajaju se od tijela incizijom vaginalnog zida neposredno iznad spoja kože potrbušnice kako je prikazano na slici. Maternicu treba odvojiti od tjelesnog zida nježnim rezanjem materničnog mezenterija u točki spajanja duž cijele duljine dorsolateralnog aspekta svakog roga maternice. Nakon odstranjivanja iz tijela, višak masnog i vezivnog tkiva treba obrezati. Ako postoje, jajnici se uklanjaju kod jajovoda, izbjegavajući gubitak luminalne tekućine iz roga maternice. Ako su životinji odstranjeni jajnici, ostatke jajnika treba pregledati radi prisutnosti bilo kakvog tkiva jajnika. Vagina se uklanja iz maternice neposredno ispod cerviksa tako da on ostane na tijelu maternice kako je prikazano na slici. Potom se maternica može izvagati.

▼M5

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Antiestrogenizacija znači sposobnost kemikalije da suzbije djelovanje estradiola 17ß u organizmu sisavca.

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Dan okota je nulti postnatalni dan.

Doziranje znači općenit pojam koji obuhvaća dozu, učestalost primjene doze i trajanje doziranja.

Doza znači količina primijenjene ispitivane kemikalije. Kod uterotropnog biotesta doza je izražena kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitne životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase/dan)

Maksimalna doza tolerancije (MDT) znači najviša količina kemikalije koja nakon primjene ne uzrokuje smrt ispitnih životinja (izražena u LD0) (IUPAC, 1993.).

Estrogenizacija znači sposobnost kemikalije da djeluje poput estradiola 17ß u organizmu sisavca.

X-ti postnatalni dan znači X-ti dan života nakon dana okota.

Osjetljivost znači udjel svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode.

Specifičnost znači udjel svih negativnih/neaktivnih tvari koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode.

Ispitivana kemikalija znači sve tvari ili smjese koje se ispituju tom ispitnom metodom.

Uterotropni je pojam kojim se opisuje pozitivan utjecaj na rast tkiva maternice.

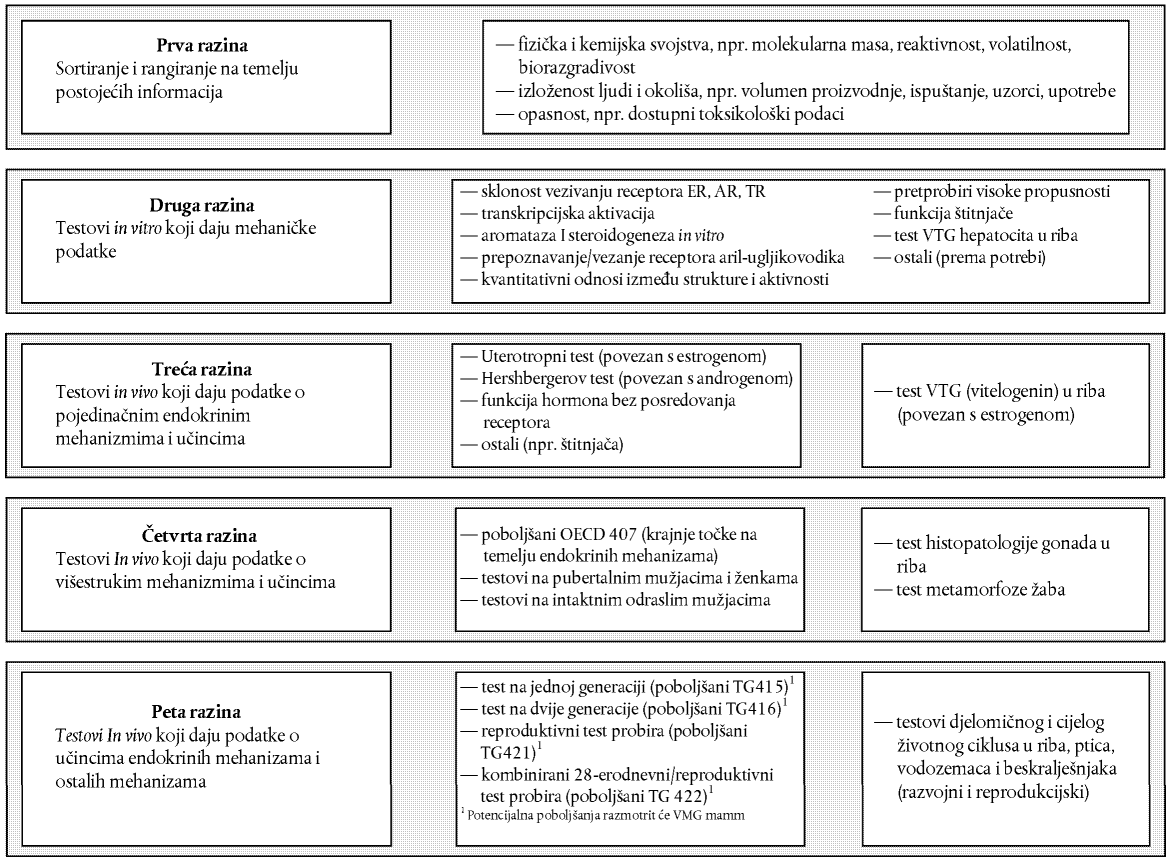
Validacija znači znanstveni postupak za karakterizaciju operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te za demonstraciju njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

▼M5

Dodatak 2.

Napomena: Dokument pripremilo tajništvo Programa smjernica za ispitivanje na temelju sporazuma postignutog na šestom sastanku radne skupine za ispitivanje i procjenu endokrinih disruptora

OECD–ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija



VMG mamm: Skupina za upravljanje validacijama ispitivanja i ocjenjivanja na sisavcima

▼**M5**

NAPOMENE UZ OKVIR

Napomena 1.: Ulazak na sve razine i izlazak iz njih mogući su te ovise o prirodi postojećih potreba za informacijama za potrebe procjene opasnosti i rizika.

Napomena 2.: Na 5. razini ekotoksikologija bi trebala uključivati krajnje točke kojima se ukazuje na mehanizme štetnih učinaka i moguću opasnost za stanovništvo.

Napomena 3.: Ako je višemodalnim modelom obuhvaćeno nekoliko jedinstvenih testova krajnjih točaka, tim će se modelom zamijeniti njihova upotreba.

Napomena 4.: Procjena svake kemikalije trebala bi se temeljiti na pojedinačnim slučajevima, uzimajući u obzir sve dostupne informacije i imajući u vidu funkciju okvirnih razina.

Napomena 5.: U ovom trenutku okvir ne treba smatrati sveobuhvatnim. Na 3., 4. i 5. razini njime su obuhvaćeni testovi koji su dostupni ili koji su u postupku validacije. Kad je riječ o potonjem, oni su povremeno obuhvaćeni. Nakon razvoja i validacije oni će se i formalno dodati okviru.

Napomena 6.: Ne treba smatrati da 5. razina uključuje samo konačne testove. Smatra se da testovi na toj razini doprinose općoj procjeni opasnosti i rizika.

▼M5

LITERATURA

(1) OECD (1998.). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, od 10. do 11. ožujka 1998., ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003.). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003.)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002.). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of theValidation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445. – 520.

(4) OECD (2006.). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006.)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001.). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogen icresponses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785. – 94.

(6) OECD (2006.). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006.)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003.). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: PhaseTwo – Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530. – 1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003.). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550. – 1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003.). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559. – 1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983.). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582. – 587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985.). The postnatal ontogeny of rat uterine glandsand age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229. – 2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001.). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10. – 15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953.). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650. – 651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975.). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425. – 427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998.). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369. – 373.

▼**M5**

(16) OECD (2007.). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002.). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145. – 157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003.). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. FoodChem. Toxicol. 41:1517. – 1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002.). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613. – 620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003.). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477. – 485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000.). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343. – 347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002.). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381. – 393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987.). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596. – 601.

(24) OECD (2008.). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000.). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000.)7.

(26) OECD (2001.). Guidance document on acute oral toxicity. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 24. ENV/JM/MONO(2001.)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935.). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85:320. – 333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936.). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33. – 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996.). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288. – 305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973.). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284. – 291.

(31) OECD (1982.). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Pariz.

(32) Dorfman R.I. (1962.). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004.). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401. – 416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998.). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159. – 184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960.). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807. – 1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004.). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410. – 1414.

(37) OECD (2007.). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

▼M5

B.55. **HERSHBERGEROV BIOTEST NA ŠTAKORIMA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA ZA (ANTI)ANDROGENA SVOJSTVA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda ekvivalentna je Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 441 (2009.). OECD je 1998. godine započeo aktivnost velikog prioriteta preispitivanja postojećih smjernica i razvoja novih smjernica za probir i ispitivanje tvari potencijalnih endokrinih disruptora (1). Jedan element aktivnosti bio je razviti smjernice ispitivanja za Hershbergerov biotest na štakorima. Nakon nekoliko desetljeća korištenja u farmaceutskoj industriji ovaj je test 1962. godine prvo standardizirao službeni odbor stručnjaka kao alat probira za androgene kemikalije (2). U razdoblju 2001.–2007. Hershbergerov biotest na štakorima bio je podvrgnut opsežnom programu validacije koji je uključivao izradu Osnovnog dokumenta za preispitivanje (Background Review Document) (23), sastavljanje detaljnog dokumenta o metodama (3), izradu smjernica za disekcije (21) i provođenje opsežnih intralaboratorijskih i interlaboratorijskih studija radi dokazivanja pouzdanosti i obnovljivosti biotesta. Te validacijske studije provedene su upotrebom snažnog referentnog androgena (testosteron propionata (TP)), dvaju snažnih sintetskih androgena (trenbolon acetata i metil testosterona), snažnog antiandrogenog lijeka (flutamida), snažnog inhibitora sinteze (finasterida) prirodnog androgena (dihidrotestosterona – DHT), nekoliko slabo antiandrogenih pesticida (linurona, vinklozolina, procimidona, p,p' DDE), snažnog inhibitora 5α-reduktaze (finasterida) i dviju poznatih negativnih kemikalija (dinitrofenola i nonilfenola) (4) (5) (6) (7) (8). Ova ispitna metoda rezultat je dugog povijesnog iskustva s biotestom i iskustva stečenog tijekom programa validacije ispitivanja i njime dobivenih rezultata.

2. Hershbergerov biotest kratki je in vivo test probira u kojem se koriste pomoćna tkiva muškog reproduktivnog trakta. Test je uveden 1930-ih godina i izmijenjen 1940-ih godina tako da uključuje mišiće koji reagiraju na androgene u muškom reproduktivnom traktu (2) (9 – 15). 1960-ih godina ocjenjivano je preko 700 mogućih androgena upotrebom standardizirane verzije protokola (2) (14) te je 1960-ih godina upotreba testa i za androgene i za antiandrogene smatrana standardnom metodom (2) (15). Sadašnji biotest temelji se na promjenama mase pet tkiva ovisnih o androgenima kod kastriranih peripubertalnih mužjaka štakora. Njime se ocjenjuje sposobnost kemikalije da izazove biološko djelovanje koje odgovara agonistima androgena, antagonistima androgena ili inhibitorima 5α-reduktaze. Pet ciljnih tkiva ovisnih o androgenima obuhvaćenih ovom ispitnom metodom jesu: ventralna prostata (VP), sjemeni vezikul (SV) (uključujući tekućinu i koagulirajuće žlijezde), levator ani-bulbokavernozni mišić (LABC), parne Cowperove žlijezde (COW) i glans penisa (GP). U kastriranog peripubertalnog mužjaka štakora svih tih pet tkiva reagira na androgene povećanjem apsolutne mase. Kada se ta tkiva stimuliraju na povećanje mase primjenom snažnog referentnog androgena, svih tih pet tkiva odgovara na antiandrogene smanjenjem apsolutne mase. Primarni model za Hershbergerov biotest kirurški je kastrirani peripubertalni mužjak, koji je validiran u fazama 1., 2. i 3. programa validacije Hershbergerova biotesta.

3. Hershbergerov biotest upotrebljava se kao mehanistički in vivo test probira za agoniste androgena, antagoniste androgena i inhibitore 5α-reduktaze te njegovu primjenu treba gledati u kontekstu „Konceptualnog okvira OECD-a za ispitivanje i ocjenjivanje kemikalija endokrinih disruptora” (Dodatak

▼M5

2.). U tom Konceptualnom okviru Hershbergerov biotest sadržan je u razini 3. kao in vivo test kojim se dobivaju podaci o jednom endokrinom mehanizmu, tj. (anti)androgenosti. Namijenjen je da bude uključen u bateriju in vitro i in vivo testova za utvrđivanje kemikalija s potencijalom interakcije s endokrinim sustavom, što u konačnici dovodi do ocjene opasnosti i rizika za zdravlje ljudi ili za okoliš.

4. Radi zabrinutosti za dobrobit životinja zbog postupka kastracije, pokušalo se upotrijebiti intaktne (nekastrirane) stimulirane mužjake upravo odbijene od sise kao alternativnog modela za Hershbergerov biotest kako bi se izbjegla kastracija. Ispitna metoda sa stimuliranim mužjacima upravo odbijenima od sise validirana je (24); međutim, tijekom validacijskih studija pokazalo se da verzijom Hershbergerova biotesta uz upotrebu mužjaka upravo odbijenih od sise nije moguće konzistentno utvrditi učinke na masu organa ovisnih o androgenima uz upotrebu slabih antiandrogena kod ispitivanih doza. Stoga ona nije uključena u ovu ispitnu metodu. Međutim, prepoznavajući da njezino korištenje ne pruža samo korist za dobrobit životinja, već da može pružiti i informacije o drugim načinima djelovanja, dostupna je u Smjernici OECD-a 115 (25).

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Agonisti i antagonisti androgena djeluju kao ligandi za androgene receptore i mogu aktivirati odnosno inhibirati transkripciju gena koji kontrolira taj receptor. Osim toga, neke kemikalije inhibiraju konverziju testosterona u snažniji prirodni androgen dihidrotestosteron u nekim ciljnim tkivima za androgene (inhibitori 5α-reduktaze). Takve kemikalije imaju potencijal uzrokovati štetne učinke po zdravlje, uključujući reproduktivne i razvojne učinke. Stoga postoji regulatorna potreba za brzom ocjenom i vrednovanjem kemikalije kao mogućeg agonista ili antagonista androgena ili inhibitora 5α-reduktaze. Iako informativan, afinitet liganda za androgeni receptor izmjeren vezanjem na receptor ili transkripcijskom aktivacijom gena izvjestitelja in vitro nije jedina determinanta moguće opasnosti. Druge determinante uključuju metaboličku aktivaciju i deaktivaciju nakon ulaska u tijelo, distribuciju kemikalije u ciljna tkiva i izlučivanje iz tijela. Zbog toga se pojavljuje potreba probira na moguće djelovanje kemikalije in vivo pod odgovarajućim uvjetima i izloženosti. In vivo vrednovanje manje je kritično ako su poznata svojstva kemikalije u pogledu Apsorpcije – Distribucije – Metabolizma – Uklanjanja (ADME). Tkiva ovisna o androgenima odgovaraju brzim i snažnim rastom na stimulaciju androgenima, posebno u kastriranih peripubertalnih mužjaka štakora. Glodavci, a osobito štakori, isto se tako široko upotrebljavaju u studijama toksičnosti za karakterizaciju opasnosti. Stoga je verzija testa u kojoj se upotrebljavaju kastrirani peripubertalni štakori primjerena za in vivo probir agonista i antagonista androgena i inhibitora 5α-reduktaze.

6. Ova ispitna metoda temelji se na protokolima korištenima u validacijskoj studiji OECD-a koja se pokazala pouzdanom i ponovljivom u intralaboratorijskim i interlaboratorijskim studijama (4) (5) (6) (7) (8). U ovoj ispitnoj metodi prikazani su postupci i s androgenima i s antiandrogenima.

7. Iako je bilo određenih varijacija u dozi TP-a upotrijebljenoj za utvrđivanje antiandrogena u programu validacije Hershbergerova biotesta OECD-a u različitim laboratorijima (0,2 u odnosu na 0,4 mg/kg/dnevno, supkutanom injekcijom), postojala je mala razlika između tih dviju varijanata protokola u pogledu sposobnosti utvrđivanja slabog ili snažnog antiandrogenog djelovanja. Međutim, jasno je da doza TP-a ne smije biti ni previsoka kako ne bi blokirala učinke slabih antagonista androgenih receptora (AR) ni tako niska da androgena tkiva pokažu slabu reakciju rasta čak i bez istovremene primjene antiandrogena.

▼M5

8. Reakcija rasta pojedinih tkiva ovisnih o androgenima nije u potpunosti androgenog podrijetla, tj. i druge kemikalije koje nisu agonisti androgena mogu uzrokovati promjenu mase određenih tkiva. Međutim, reakcija istovremenog rasta nekoliko vrsta tkiva potkrepljuje postojanje mehanizma specifičnijeg za androgene. Na primjer, velike doze snažnih estrogena mogu povećati masu sjemenih vezikula; međutim, druga tkiva ovisna o androgenima u testu ne reagiraju na sličan način. Antiandrogene kemikalije mogu djelovati ili kao antagonisti androgenih receptora ili kao inhibitori 5α-reduktaze. Inhibitori 5α-reduktaze imaju promjenjiv učinak zbog toga što se konverzija u snažniji dihidrotestosteron razlikuje s obzirom na vrstu tkiva. Antiandrogeni koji inhibiraju 5α-reduktazu, kao što je finasterid, imaju izraženiji učinak na ventralnu prostatu nego na druga tkiva u usporedbi sa snažnim antagonistom AR-a, kao što je flutamid. Ova razlika u reakciji tkiva može se upotrebljavati za razlikovanje između načina djelovanja posredovanih AR-om i 5α-reduktazom. Osim toga, androgeni receptor evolucijski je povezan s receptorom drugih steroidnih hormona te neki drugi hormoni, kada se primijene u visokim, suprafiziološkim dozama, mogu vezati i antagonizirati učinke poticanja rasta TP-a (13). Nadalje, vjerojatno je i da bi povećani metabolizam steroida i posljedično smanjenje testosterona u serumu mogli smanjiti rast tkiva ovisan o androgenima. Stoga svaki pozitivan rezultat u Hershbergerovu biotestu treba uobičajeno vrednovati primjenom pristupa mase dokaza, uključujući testove in vitro, kao što su testovi vezivanja AR-a i estrogenskih receptora (ER) i odgovarajući testovi transkripcijske aktivacije, ili iz drugih testova in vivo kojima se ispituju slična ciljna tkiva za androgene kao što je test na pubertalnim mužjacima, 15-dnevni test na intaktnim odraslim mužjacima ili 28-dnevne ili 90-dnevne studije s ponovljenim dozama.

9. Iskustvo upućuje na to da su ksenobiotski androgeni rjeđi od ksenobiotskih antiandrogena. Stoga je za očekivati da će se Hershbergerov biotest najčešće upotrebljavati za probir antiandrogena. Međutim, bez obzira na to, postupak ispitivanja na androgene mogao bi se preporučiti za steroidne kemikalije ili kemikalije slične steroidima ili za kemikalije za koje pretpostavka mogućih androgenih učinaka proizlazi iz metoda sadržanih u razini 1. ili 2. konceptualnog okvira (Dodatak 2.). Slično tome, štetni učinci povezani s (anti)androgenim profilima mogu se uočiti u testovima razine 5., što dovodi do potrebe za procjenom djeluje li kemikalija endokrinim načinom djelovanja.

10. Potvrđeno je da svi postupci u kojima se upotrebljavaju životinje trebaju biti sukladni s lokalnim standardima brige o životinjama; opisi brige i tretmana navedeni u nastavku minimalni su standardi provedbe i bit će zamijenjeni lokalnim propisima kao što je Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (26). OECD je dao dodatne smjernice o humanom postupanju sa životinjama (17).

11. Kao i kod svih biotestova u kojima se koriste pokusne životinje, treba pomno razmotriti potrebu za provođenjem ove studije. U osnovi mogu postojati dva razloga za takvu odluku:

— velik potencijal izloženosti (razina 1. konceptualnog okvira) ili indikacije (anti)androgenosti u testovima in vitro (razina 2.) koji podupiru provedbu istraživanja o tome mogu li se takvi učinci pojaviti in vivo,

— učinci koji upućuju na (anti)androgenost u in vivo testovima razine 4. ili 5. koji podupiru provedbu istraživanja specifičnog načina djelovanja, tj. kako bi se utvrdilo jesu li učinci posljedica (anti)androgenog mehanizma.

▼M5

12. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

NAČELO TESTA

13. Pri Hershbergerovu biotestu osjetljivost se postiže upotrebom mužjaka s minimalnom proizvodnjom androgena. To se postiže upotrebom kastriranih mužjaka pod uvjetom da je nakon kastracije proteklo dovoljno vremensko razdoblje za regresiju ciljnih tkiva na minimalnu i ujednačenu polaznu masu. Tako kod probira potencijalnog androgenog djelovanja postoje niske endogene razine cirkulirajućih androgena, os hipotalamus – hipofiza – gonade nije to u stanju kompenzirati povratnim mehanizmima, sposobnost tkiva na reakciju je maksimizirana te je početna varijabilnost mase tkiva svedena na najmanju moguću mjeru. Kod probira potencijalnog antiandrogenog djelovanja može se postići konzistentniji dobitak na masi tkiva kada se tkiva stimuliraju referentnim androgenom. Posljedično, za Hershbergerov biotest potrebno je samo 6 životinja po skupini koja prima određenu dozu dok se za druge testove s intaktnim pubertalnim ili odraslim mužjacima preporučuje korištenje 15 mužjaka po skupini koja prima određenu dozu.

14. Kastraciju peripubertalnih mužjaka štakora treba provoditi na odgovarajući način upotrebom odobrenih anestetika i aseptičnom tehnikom. Prvih nekoliko dana nakon operacije treba primijeniti analgetike kako bi se uklonile postoperacijske tegobe. Kastracija povećava preciznost testa kod određivanja slabih androgena i antiandrogena uklanjanjem kompenzatornih povratnih endokrinih mehanizama prisutnih kod intaktnih životinja koji mogu ublažiti učinke primijenjenih androgena i antiandrogena te uklanjanjem velike interindividualne varijabilnosti razina testosterona u serumu. Stoga se kastracijom smanjuje broj životinja potrebnih za probir na ta endokrina djelovanja.

15. Pri probiru potencijalnog androgenog djelovanja ispitivana se kemikalija primjenjuje svakodnevno oralnom intubacijom ili supkutanom (sc) injekcijom tijekom deset uzastopnih dana. Ispitivane kemikalije primjenjuju se na najmanje dvije tretirane skupine pokusnih životinja primjenom jedne doze po skupini. Životinje se podvrgavaju nekropsiji oko 24 sata nakon primjene posljednje doze. Statistički značajno povećanje mase dvaju ili više ciljnih organa u skupina tretiranih ispitivanom kemikalijom u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je primala nosač upućuje na to da je ispitivana kemikalija pozitivna na potencijalno androgeno djelovanje (vidjeti stavak 60.). Androgeni, kao što je trenbolon, koji ne mogu biti reducirani 5α – reduktazom, imaju izraženije učinke na LABC i GP u odnosu na TP, ali povećani rast treba se prikazati na svim tkivima.

16. Pri probiru potencijalnog antiandrogenog djelovanja ispitivana se kemikalija primjenjuje svakodnevno oralnom intubacijom ili supkutanom injekcijom tijekom deset uzastopnih dana zajedno s dnevnim dozama TP-a (0,2 ili 0,4 mg/kg/dnevno) sc. injekcijom. U programu validacije utvrđeno je da se može koristiti ili 0,2 ili 0,4 mg/kg/dnevno TP-a zbog toga što su obje doze bile učinkovite kod utvrđivanja antiandrogena te stoga za korištenje u testu treba odabrati samo jednu dozu. Graduirane doze ispitivane kemikalije primjenjuju se na najmanje tri tretirane skupine pokusnih životinja primjenom jedne doze po skupini. Životinje se podvrgavaju nekropsiji oko 24 sata nakon primjene posljednje doze. Statistički značajno smanjenje mase dvaju ili više ciljnih organa u skupina tretiranih ispitivanom kemikalijom i TP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je primala samo TP upućuje na to da je ispitivana kemikalija pozitivna na potencijalno antiandrogeno djelovanje (vidjeti stavak 61.).

▼M5

OPIS METODE

Odabir vrste i soja

17. Od 1930-ih godina štakori se rutinski upotrebljavaju za Hershbergerov biotest. Iako je biološki vjerojatno da bi i štakori i miševi imali slične reakcije, na temelju 70 godina iskustva s modelom štakora, za Hershbergerov biotest štakor je vrsta izbora. Osim toga, s obzirom na to da podaci dobiveni Hershbergerovim biotestom mogu biti preliminarni podaci za dugoročnu multigeneracijsku studiju, time se omogućuje da se u obje studije upotrebljavaju životinje iste vrste, soja i podrijetla.

18. Ovaj protokol omogućuje da laboratoriji odaberu soj štakora koji će se upotrebljavati za test koji bi u pravilu trebao biti soj koji je laboratorij koji sudjeluje u ispitivanju upotrebljavao u prošlosti. Mogu se upotrebljavati uobičajeno korišteni sojevi laboratorijskih štakora; međutim, ne bi trebalo koristiti sojeve koji sazrijevaju znatno kasnije nakon 42. dana starosti s obzirom na to da bi kastracija tih mužjaka u dobi od 42 dana mogla onemogućiti mjerenje glansa penisa, koje se može provesti nakon što se prepucij razdvoji od tijela penisa. Tako ne bi trebalo koristiti sojeve dobivene od štakora Fisher 344, osim u rijetkim slučajevima. Štakori Fisher 344 imaju različito vrijeme spolnog razvoja u usporedbi s drugim češće upotrebljavanim sojevima kao što su sojevi Sprague Dawley ili Wistar (16). Ako se upotrebljava takav soj, štakore treba kastrirati u laboratoriju u nešto starijoj dobi i laboratorij treba moći dokazati osjetljivost upotrebljavanog soja. Laboratorij treba dati jasno obrazloženje za odabir soja štakora. Ako bi test probira mogao biti preliminarni test za studiju s oralnom primjenom ponovljenih doza, reproduktivnu ili razvojnu studiju, ili dugoročnu studiju, u svim studijama treba po mogućnosti upotrebljavati životinje istog soja i podrijetla.

Uvjeti smještaja i prehrane

19. Svi postupci trebali bi biti sukladni s lokalnim standardima brige za laboratorijske životinje. Ovi opisi brige i tretmana minimalni su standardi provedbe i bit će zamijenjeni strožim lokalnim propisima, kao što je Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (26). Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (unutar raspona od oko ± 3 °C). Relativna vlaga treba biti minimalno 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Cilj bi trebao biti relativna vlaga od 50 – 60 %. Osvjetljenje treba biti umjetno. Dnevni redoslijed svjetla treba biti 12 sati svjetla, 12 sati tame.

20. Preporučljiv je smještaj u skupinama u odnosu na izolaciju zbog mlade dobi životinja i činjenice da su štakori društvene životinje. Smještanjem dviju ili tri životinja po kavezu izbjegava se prenapučenost i s njom povezan stres koji bi mogao ometati hormonalnu kontrolu razvoja pomoćnog spolnog tkiva. Kaveze treba temeljito očistiti kako bi se uklonili mogući kontaminanti i smjestiti na takav način da se mogući učinci zbog smještaja kaveza svedu na najmanju moguću mjeru. Kavezima odgovarajuće veličine (~2 000 kvadratnih centimetara) sprečava se prenapučenost.

21. Svaku životinju treba individualno označiti (npr. oznakom ili markicom na uhu) primjenom humane metode. Metodu identifikacije treba zabilježiti.

▼M5

22. Laboratorijsku hranu i vodu za piće treba osigurati ad libitum. Laboratoriji koji provode Hershbergerov biotest trebali bi upotrebljavati laboratorijsku prehranu koju uobičajeno upotrebljavaju kod rada na ispitivanju kemikalija. U studijama validacije biotesta nisu uočeni učinci ili varijacije koje bi se mogle pripisati prehrani. Upotrijebljenu prehranu treba zabilježiti i zadržati uzorak laboratorijske hrane za moguću buduću analizu.

Kriteriji učinkovitosti za masu organa ovisnih o androgenima

23. Tijekom validacijske studije nisu postojali dokazi da je smanjenje tjelesne mase utjecalo na povećanje ili smanjenje rasta mase ciljnih tkiva (tj. to treba biti ponderirano u ovoj studiji).

24. Među različitim sojevima štakora koji su uspješno upotrijebljeni u programu validacije, mase organa ovisnih o androgenima bile su veće u težih sojeva štakora nego u lakših sojeva. Stoga kriteriji učinkovitosti Hershbergerova biotesta ne obuhvaćaju apsolutne očekivane mase organa za pozitivne i negativne kontrolne skupine.

25. Budući da je koeficijent varijacije (CV) za neko tkivo u obrnuto proporcionalnom odnosu sa statističkom snagom, kriteriji učinkovitosti Hershbergerova biotesta temelje se na maksimalnim vrijednostima CV-a za svako tkivo (tablica 1.). CV-ovi se izvode iz validacijskih studija OECD-a. U slučaju negativnih rezultata laboratoriji bi trebali ispitati CV-ove iz kontrolne skupine i skupine koja je tretirana visokom dozom kako bi utvrdili jesu li premašeni maksimalni kriteriji učinkovitosti CV-a.

26. Studiju treba ponoviti kada: 1. tri ili više od deset mogućih pojedinačnih CV-ova u kontrolnoj skupini i u skupini koja je tretirana visokom dozom premašuje maksimume utvrđene za studije agonista i antagonista u tablici 1. i 2. najmanje dva ciljna tkiva bila su marginalno neznačajna, tj. ρ vrijednosti bile su između 0,05 i 0,10.

Tablica 1.

Maksimalni dopušteni CV-ovi određeni za ciljna pomoćna spolna tkiva za model kastriranih mužjaka u validacijskim studijama OECD-a ([1])**.**

Tkivo	Antiandrogeni učinci	Androgeni učinci
Sjemeni vezikuli	40 %	40 %
Ventralna prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperove žlijezde	35 %	55 %
Glans penisa	17 %	22 %

([1]) Prag CV-a za određeno tkivo utvrđen je iz grafikona CV vrijednosti – uređen sekvencijalno od najmanje do najveće – za sve srednje vrijednosti iz svih pokusa provedenih tijekom validacije upotrebom posebnog modela (agonist ili antagonist). Prag CV-a očitan je od točke na kojoj su povećanja između sljedećih najvećih CV-ova u seriji dramatično veća od nekoliko prethodnih CV-ova- „prekretnice”. Treba napomenuti da, iako su ovom analizom identificirane relativno pouzdane „prekretnice” za model antagonista u testu, krivulje CV-a za test agonista pokazale su ujednačenije povećanje zbog čega je identifikacija praga CV-a ovom metodom donekle proizvoljna.

▼M5

POSTUPAK

Regulatorna sukladnost i laboratorijska verifikacija

27. Za razliku od uterotrofnog testa (poglavlje B.54. ovog Priloga), za Hershbergerov test nije potrebno dokazivanje kompetencije laboratorija za započinjanje studije zbog toga što se pozitivna (testosteron propionat i flutamid) i negativna kontrola provode istodobno kao sastavni dio testa.

Broj i stanje životinja

28. Svaka tretirana i kontrolna skupina treba obuhvaćati najmanje 6 životinja. Ovo se odnosi i na androgene i antiandrogene protokole.

Kastracija

29. Treba postojati početno razdoblje aklimatizacije od nekoliko dana nakon primitka životinja kako bi se osiguralo da su životinje zdrave i da napreduju. Budući da u životinja koje su kastrirane prije 42. dana života ili 42. postnatalnog dana (pnd) ne mora doći do razdvajanja prepucija, životinje treba kastrirati 42. pnd ili kasnije, ne prije. Životinje se kastriraju pod anestezijom zarezivanjem skrotuma i uklanjanjem obaju testisa i epididimisa uz podvezivanje krvnih žila i sjemenovoda. Nakon provjere da nije došlo do krvarenja skrotum treba zatvoriti šavovima ili klipsama. Prvih nekoliko dana nakon operacije životinjama treba davati analgetike kako bi se ublažile postoperacijske tegobe. Ako se kastrirane životinje kupuju od dobavljača, dobavljač treba garantirati dob životinja i stupanj spolne zrelosti.

Aklimatizacija nakon kastracije

30. Treba nastaviti aklimatizaciju životinja na laboratorijske uvjete kako bi se omogućila regresija mase ciljnih tkiva najmanje sedam dana nakon kastracije. Životinje treba svakodnevno promatrati te ukloniti sve životinje u kojih se pokažu znakovi bolesti ili fizičke abnormalnosti. Tako tretman primjenom doza (za studiju) može započeti već u dobi od 49. pnd, ali ne kasnije od 60. pnd. Dob pri nekropsiji ne smije biti veća od 70. pnd. Ova fleksibilnost omogućuje laboratoriju da učinkovito planira eksperimentalni rad.

Tjelesna masa i randomizacija skupina

31. Razlike u individualnoj tjelesnoj masi uzrok su varijabilnosti kako unutar skupine, tako i među skupinama životinja. Povećanje varijabilnosti mase tkiva ima za posljedicu povećani koeficijent varijacije (CV) i smanjuje statističku snagu testa (koja se ponekad naziva osjetljivost testa). Stoga varijacije tjelesne mase treba kontrolirati i eksperimentalno i statistički.

32. Eksperimentalna kontrola uključuje izazivanje malih varijacija tjelesne mase unutar i među ispitivanim skupinama. Kao prvo, treba izbjegavati neuobičajeno male ili velike životinje i ne uključivati ih u ispitivanu kohortu. Na početku studije varijacija mase životinja ne bi smjela prelaziti ± 20 % srednje mase (npr. 175 g ± 35 g za kastrirane peripubertalne štakore). Kao drugo, životinje treba rasporediti u skupine (kako kontrolne tako i tretirane) randomizacijom distribucije mase, tako da srednja tjelesna masa svake skupine ne bude statistički različita od bilo koje druge skupine. Upotrijebljeni postupak blok randomizacije treba zabilježiti.

▼M5

33. Budući da toksičnost može smanjiti tjelesnu masu tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu, tjelesna masa prvog dana primjene ispitivane kemikalije može se upotrijebiti kao statistička kovarijanta umjesto tjelesne mase kod nekropsije.

Doziranje

34. Kako bi se utvrdilo može li ispitivana kemikalija imati androgeno djelovanje in vivo, obično su dovoljne dvije skupine koje primaju određenu dozu ispitivane kemikalije uz pozitivnu skupinu i skupinu koja prima nosač (negativnu skupinu) (vidjeti stavak 43.) te je ovaj oblik poželjan zbog razloga dobrobiti životinja. Ako je svrha ili dobiti krivulju doza – reakcija ili ekstrapolirati na niže doze, potrebne su barem tri skupine koje primaju određenu dozu. Ako su potrebne i druge informacije, uz utvrđivanje androgene aktivnosti (kao što je procjena učinkovitosti), treba razmotriti različit režim doziranja. Za ispitivanje na antiandrogene ispitivana se kemikalija primjenjuje zajedno s referentnim androgenim agonistom. Treba upotrebljavati najmanje tri ispitne skupine s različitim dozama ispitivane kemikalije te pozitivnu i negativnu kontrolu (vidjeti stavak 44.). Osim tretmana ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao i sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se kod primjene ispitivane kemikalije upotrebljava nosač, kontrolna skupina treba primati nosač u najvećem volumenu koji se upotrebljava kod ispitnih skupina.

35. Sve visine doza treba predlagati i odabirati uzimajući u obzir sve postojeće dostupne podatke o toksičnosti i (toksiko-) kinetičke podatke za ispitivanu kemikaliju ili srodne materijale. Pri određivanju najviše doze treba prvo uzeti u obzir LD50 i/ili podatke o akutnoj toksičnosti kako bi se izbjeglo ugibanje, jaka patnja ili stres u životinja (17) (18) (19) (20) te, kao drugo, treba uzeti u obzir dostupne podatke o dozama upotrijebljenima u ispitivanjima subkronične i kronične toksičnosti. Općenito, najviša doza ne smije uzrokovati smanjenje konačne tjelesne mase životinja veće od 10 % mase životinja u kontrolnoj skupini. Najviša doza treba biti ili 1. najviša doza kojom se osigurava preživljavanje životinja i koja nema značajnu toksičnost i ne uzrokuje patnju životinja nakon deset uzastopnih dana primjene sve do maksimalne doze od 1 000 mg/kg/dnevno (vidjeti stavak 36.) ili 2. doza koja izaziva (anti)androgene učinke, ovisno o tome koja je niža. Kao probir, prihvatljivi su veliki intervali između doziranja, npr. polovina log jedinice (što odgovara progresiji doze od 3,2) ili čak jedna log jedinica. Ako nisu dostupni odgovarajući podaci, može se provesti studija za utvrđivanje raspona (vidjeti stavak 37.) kao pomoć prilikom određivanja doza koje će se upotrebljavati.

Granična doza

36. Ako test s graničnom dozom od 1 000 mg/kg tjelesne mase/dnevno i niža doza uz upotrebu opisanih postupaka za ovu studiju ne uspije uzrokovati statistički značajnu promjenu mase reproduktivnih organa, tada se dodatne visine doze mogu smatrati nepotrebnima. Primjenjuje se granična doza osim kada podaci o izloženosti ljudi ne upućuju na potrebu korištenja veće doze.

Razmatranja o utvrđivanju raspona doza

37. Ako je potrebno, može se provesti preliminarna studija utvrđivanja raspona doza s nekoliko životinja kako bi se odabrale odgovarajuće skupine koje će primati određenu dozu (upotrebom ispitnih metoda akutne toksičnosti (poglavlja B.1.A, B.1.B ovog Priloga (27), OECD TG 425 (19))). U slučaju Hershbergerova biotesta cilj je odabrati doze koje osiguravaju preživljavanje životinja i koje nemaju značajnu toksičnost i ne izazivaju

▼M5

patnju životinja nakon deset uzastopnih dana primjene kemikalije do granične doze od 1 000 mg/kg/dnevno kako je navedeno u stavcima 35. i 36. U tom pogledu može se upotrijebiti jedna Smjernica OECD-a (17) u kojoj su definirani klinički znakovi koji upućuju na toksičnost ili patnju životinja. Ako je izvedivo u okviru ove studije za određivanje raspona doza nakon deset dana primjene kemikalije, ciljni organi mogu se ekscidirati i izvagati otprilike 24 sata nakon primjene posljednje doze. Ti se podaci tada mogu upotrebljavati kao pomoć kod odabira doza za glavnu studiju.

Referentne kemikalije i nosač

38. Referentni androgeni agonist treba biti testosteron propionat (TP), CAS br. 57-82-5. Referentna doza TP-a može biti ili 0,2 mg/kg – tjelesne mase/dnevno ili 0,4 mg/kg – tjelesne mase/dnevno. Referentni androgeni antagonist treba biti flutamid (FT), CAS br. 1311-84-7. Referentna doza FT-a treba biti 3 mg/kg – tjelesne mase/dnevno, a FT treba primijeniti istodobno s referentnom dozom TP-a.

39. Preporučuje se, kad god je to moguće, najprije razmotriti upotrebu vodene otopine/suspenzije. Međutim, s obzirom na to da su brojni androgeni ligandi ili njihovi metabolički prekursori hidrofobni, najuobičajeniji pristup upotreba je otopine/suspenzije u ulju (npr. kukuruznom, kikirikijevu, sezamovu ili maslinovu ulju). Ispitivane kemikalije mogu se otopiti u minimalnoj količini od 95 % etanola ili drugih odgovarajućih otapala i razrijediti do konačne radne koncentracije u ispitnom nosaču. Toksična svojstva otapala trebala bi biti poznata te ih treba ispitati u zasebnoj kontrolnoj skupini koja prima samo otapalo. Ako se ispitivana kemikalija smatra stabilnom, može se upotrijebiti lagano zagrijavanje i snažno mehaničko djelovanje kao pomoć pri otapanju ispitivane kemikalije. Treba utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije u nosaču. Ako je ispitivana kemikalija stabilna tijekom trajanja studije, tada se može pripremiti jedan početni alikvot ispitivane kemikalije, a specificirana razrjeđenja doze mogu se pripremati svaki dan pazeći da se izbjegne kontaminacija i kvarenje uzoraka.

Primjena doza

40. TP treba primjenjivati supkutanom injekcijom, a FT oralnom intubacijom.

41. Ispitivana kemikalija primjenjuje se oralnom intubacijom ili supkutanom injekcijom. Prilikom odabira načina primjene treba uzeti u obzir pitanja dobrobiti životinja i fizikalna/kemijska svojstva ispitivane kemikalije. Osim toga, treba uzeti u obzir toksikološke aspekte kao što je relevantnost za način izloženosti ljudi kemikaliji (npr. oralna intubacija kao model za unos na usta, supkutana injekcija kao model za inhalaciju ili apsorpciju kožom) te postojeće toksikološke informacije i podatke o metabolizmu i kinetici (npr. potrebu za izbjegavanjem metabolizma prvog prolaza, bolju učinkovitost kod određenog načina primjene) prije nego što se započne opsežno, dugoročno ispitivanje ako su injekcijom dobiveni pozitivni rezultati.

42. Životinjama treba davati kemikaliju istim načinom primjene i u isto vrijeme deset uzastopnih dana u intervalima od otprilike 24 sata. Visinu doze treba svakodnevno podešavati na temelju istovremenoga svakodnevnog mjerenja tjelesne mase. Volumen doze i vrijeme njezine primjene treba bilježiti za svaki dan izlaganja. Treba obratiti pozornost da se ne premaši maksimalna doza navedena u stavku 35. kako bi se omogućilo smisleno tumačenje rezultata. U tom pogledu treba temeljito procijeniti smanjenje tjelesne mase, kliničke znakove i druge nalaze. Kod oralne intubacije treba koristiti želučanu sondu ili odgovarajuću intubacijsku kanilu. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini pokusne životinje.

▼M5

Treba postupati u skladu s lokalnim smjernicama brige o životinjama, ali volumen ne smije premašivati 5 ml/kg tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina kada se može dati 10 ml/kg tjelesne mase. Kod supkutanih injekcija doze se mogu primjenjivati u dorzoskapularnoj i/ili lumbarnoj regiji sterilnom iglom (npr. profila 23 ili 25) i tuberkulinskom špricom. Brijanje mjesta injektiranja je opcionalno. Sve gubitke, curenje na mjestu injektiranja ili nepotpuno doziranje treba zabilježiti. Ukupni volumen injektiran svakom štakoru dnevno ne smije premašiti 0,5 ml/kg tjelesne mase.

Specifični postupci za androgene agoniste

43. Kod ispitivanja androgenih agonista nosač je negativna kontrola, a skupina tretirana TP-om pozitivna je kontrola. Biološka aktivnost koja odgovara aktivnosti androgenih agonista ispituje se primjenom ispitivane kemikalije na tretiranim skupinama u odabranim dozama tijekom deset uzastopnih dana. Masa pet pomoćnih spolnih tkiva iz skupine koja je primala ispitivanu kemikaliju uspoređuje se sa skupinom koja je primala nosač kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajno povećanje mase.

Specifični postupci za androgene antagoniste i inhibitore 5α-reduktaze

44. Kod ispitivanja androgenih antagonista i inhibitora 5α-reduktaze skupina tretirana TP-om negativna je kontrola, a skupina kojoj su istodobno davane referentne doze TP-a i FT-a pozitivna je kontrola. Biološka aktivnost koja odgovara aktivnosti androgenih antagonista i inhibitora 5α-reduktaze ispituje se primjenom referentne doze TP-a i primjenom ispitivane kemikalije tijekom deset uzastopnih dana. Masa pet pomoćnih spolnih tkiva iz skupine koja je primala TP zajedno sa skupinama koje su primale ispitivanu kemikaliju uspoređuje se sa skupinom koja je primala samo referentne doze TP-a kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajno smanjenje mase.

OPAŽANJA

Klinička opažanja

45. Opća klinička opažanja treba provoditi barem jednom tjedno te češće kada se uoče znakovi toksičnosti. Opažanja treba po mogućnosti provoditi u isto vrijeme svaki dan i uzimajući u obzir predviđeno razdoblje vršnih učinaka nakon primjene doze. U svih životinja treba opažati pojavu uginuća, pobola i općih kliničkih znakova kao što su promjene ponašanja, promjene na koži, krznu, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka te izlučine i aktivnost autonomnog živčanog sustava (npr. lakrimaciju, piloerekciju, veličinu zjenica, nepravilnosti u disanju).

46. Sve uginule životinje treba ukloniti i uništiti bez daljnje analize podataka. Sve slučajeve uginuća životinja prije nekropsije treba uključiti u izvješće studije zajedno sa svim očiglednim razlozima uginuća. Sve umiruće životinje trebale bi biti humano usmrćene. Sve umiruće i kasnije eutanazirane životinje treba uključiti u izvješće studije s očiglednim razlozima za pobol.

▼M5

Tjelesna masa i potrošnja hrane

47. Sve životinje treba vagati svakodnevno s točnošću od 0,1 g, s početkom neposredno prije započinjanja tretmana, tj. prilikom raspoređivanja životinja u skupine. Kao opcionalno mjerenje, količina hrane potrošene tijekom razdoblja tretiranja može se mjeriti po kavezu vaganjem hranilica. Rezultate potrošnje hrane treba izraziti u gramima po štakoru dnevno.

Disekcija i mjerenje mase tkiva i organa

48. Oko 24 sata nakon posljednje primjene ispitivane kemikalije štakore treba eutanazirati i eksangvinirati u skladu s uobičajenim postupcima laboratorija koji provodi ispitivanje te provesti nekropsiju. Metodu humanog usmrćenja treba zabilježiti u laboratorijskom izvješću.

49. U idealnom slučaju, redoslijed nekropsija trebao bi biti određen slučajnim odabirom među skupinama kako bi se izbjegla progresija izravno od skupina koje su primale veću dozu prema skupinama koje su primale manju dozu ili obratno koja bi mogla utjecati na podatke. Sve nalaze nekropsije, tj. patološke promjene/vidljive lezije zabilježiti i unijeti u izvješće.

50. Treba izmjeriti pet tkiva ovisnih o androgenima (VP, SV, LABC, COW, GP). Ta tkiva treba ekscidirati, pažljivo s njih ukloniti okolna tkiva i masno tkivo te odrediti njihovu svježu (nefiksiranu) masu. Sa svakim tkivom treba postupati s posebnom pažnjom kako bi se izbjegao gubitak tekućine i izbjeglo isušivanje, što može uzrokovati značajne pogreške i varijabilnost tako da se zabilježe manje mase. Neka tkiva mogu biti vrlo mala ili teška za disekciju te će to unijeti varijabilnost. Stoga je važno da osobe koje provode disekciju pomoćnih spolnih tkiva budu upoznate sa standardnim postupcima disekcije tih tkiva. Priručnik sa standardnim operativnim postupkom (SOP) za disekciju na raspolaganju je u OECD-u (21). Pomnjivom obukom u skladu sa smjernicom SOP-a potencijalni uzrok varijacija u studiji smanjit će se na najmanju moguću mjeru. U idealnom slučaju ista osoba trebala bi biti odgovorna za disekciju određenog tkiva kako bi se uklonile interindividualne razlike u obradi tkiva. Ako to nije moguće, nekropsiju treba planirati tako da svaka osoba radi disekciju određene vrste tkiva iz svih tretiranih skupina, a ne da jedna osoba radi disekciju svih tkiva iz kontrolne skupine, dok je druga osoba odgovorna za tretirane skupine. Svako pomoćno spolno tkivo treba izvagati bez bojanja s točnošću od 0,1 mg te zabilježiti masu za svaku životinju.

51. Neka tkiva mogu biti vrlo mala ili teška za disekciju te će to unijeti varijabilnost. Prethodni radovi upućuju na raspon koeficijenta varijacija (CVs) za koji se čini da se razlikuje ovisno o kvaliteti rada laboratorija. U nekoliko slučajeva velike razlike u apsolutnoj masi tkiva kao što je VP i COWS uočene su unutar pojedinog laboratorija.

52. Opcionalno se može mjeriti masa jetara, bubrega u paru i obiju nadbubrežnih žlijezda u paru. I ovdje s tkiva treba ukloniti sve okolno vezivno i masno tkivo. Jetra treba izvagati i zabilježiti masu s točnošću od 0,1 g, a bubrege u paru i nadbubrežne žlijezde u paru treba izvagati i zabilježiti masu s točnošću od 0,1 mg. Na jetra, bubrege i nadbubrežne žlijezde ne utječu samo androgeni; oni daju i korisne indicije sustavne toksičnosti.

▼**M5**

53. Mjerenje luteinizirajućeg hormona (LH) u serumu, folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i testosterona (T) je opcionalno. Razine testosterona u serumu korisne su za utvrđivanje uzrokuje li ispitivana kemikalija metabolizam testosterona u jetrima, smanjujući razine u serumu. Bez podataka o testosteronu moglo bi se činiti da takav učinak nastaje antiandrogenim mehanizmom. Razine LH-a pružaju informacije o sposobnosti određenog antiandrogena ne samo da smanji masu organa, već i da utječe na funkciju hipotalamus – hipofiza, što u dugoročnim studijama može dovesti do tumora testisa. FSH je važan hormon za spermatogenezu. Mjerenja T4 i T3 isto su tako opcionalna, a ona bi mogla pružiti dodatne informacije o sposobnosti remećenja homeostaze hormona štitne žlijezde. Ako se provode mjerenja hormona, štakore treba anestezirati prije nekropsije i krv uzeti punkcijom srca, a metodu anestezije treba pažljivo odabrati kako ne bi utjecala na mjerenje hormona. Treba zabilježiti metodu pripreme seruma, izvor kompleta za radioimunotest ili druga mjerenja, analitičke postupke te rezultate. Razine LH-a treba navesti kao ng po ml seruma, a T treba isto navesti kao ng po ml seruma.

54. Disekcija tkiva opisana je kako slijedi s detaljnim smjernicama za disekciju s fotografijama objavljenima kao dodatni materijali kao dio programa validacije (21). Video s disekcijom isto je tako na raspolaganju na internetskoj stranici Korejske uprave za hranu i lijekove (22).

— Pri ventralnoj površini životinje prema gore utvrdite je li se prepucij penisa razdvojio od glansa penisa. Ako jest, povucite prepucij i uklonite glans penisa, izmjerite ga (s točnošću od 0,1 mg), i zabilježite masu.

— Otvorite abdominalnu kožu i stjenku, otkrivajuću utrobu. Ako se važu opcionalni organi, izvadite i izvažite jetra s točnošću od 0,1 g, uklonite želudac i crijeva, izvadite i izvažite bubrege u paru i nadbubrežne žlijezde u paru s točnošću od 0,1 mg. Ovom disekcijom otkriva se mokraćni mjehur i započinje disekcija ciljnih muških pomoćnih tkiva.

— Kako biste disecirali VP, odvojite mokraćni mjehur od sloja ventralnih mišića prerezavši vezivno tkivo po sredini. Odmaknite mokraćni mjehur prema naprijed prema sjemenim vezikulima (SV), otkrivajući lijevi i desni režanj ventralne prostate (koji je pokriven slojem masnog tkiva). Pažljivo odvojite masno tkivo s desnog i lijevog režnja VP-a. Pažljivo odmaknite desni režanj VP-a od uretre i disecirajte režanj iz uretre. Još pridržavajući desni režanj VP-a pažljivo odmaknite lijevi režanj VP-a od uretre i zatim ga disecirajte; izvažite s točnošću od 0,1 mg i zabilježite masu.

— Kako biste disecirali SVCG, odmaknite mokraćni mjehur kaudalno, otkrivajući vas deferens i desni i lijevi režanj sjemenih vezikula zajedno s koagulirajućim žlijezdama (SVCG). Spriječite istjecanje tekućine postavljanjem hemostata na bazi SVCG-a, na mjestu na kojem se vas deferens spaja na uretru. Pažljivo disecirajte SVCG, uz postavljeni hemostat uklonite masno tkivo i adnekse, stavite ih u tariranu posudicu za vaganje, skinite hemostat, izvažite s točnošću od 0,1 mg i zabilježite masu.

▼M5

— Kako biste disecirali levator ani i bulbokavernozne mišiće (LABC), mišići i baza penisa su otkriveni. Mišići LA omotani su oko kolona, dok su prednji mišići LA-a i BC-a pričvršćeni na bulbus penisa. Uklanja se koža i adneksi iz perianalne regije koji se prostiru od baze penisa do prednjeg kraja anusa. Mišići BC-a se postupno diseciraju od bulbusa penisa i tkiva. Kolon se prereže na dva dijela te se cijeli LABC može disecirati i ukloniti. S LABC-a treba ukloniti masno tkivo i adnekse, izvagati ih s točnošću od 0,1 mg, i zabilježiti masu.

— Nakon što je LABC uklonjen, vidljive su Cowperove ili bulbouretralne žlijezde (COW) na bazi, i lagano dorzalno do, bulbusa penisa. Potrebna je pažljiva disekcija kako bi se izbjeglo zarezivanje tanke kapsule te spriječilo istjecanje tekućine. Izvažite COW u paru s točnošću od 0,1 mg, i zabilježite masu.

— Osim toga, ako tijekom nekropsije i disekcije dođe do gubitka tekućine iz bilo koje žlijezde, to treba zabilježiti.

55. Ako ocjenjivanje svake kemikalije zahtijeva nekropsiju više životinja nego što je prihvatljivo u jednom danu, započinjanje studije može se provesti u dva stupnja tijekom dvaju uzastopnih dana, što ima za posljedicu provođenje nekropsije i postupaka povezanih s njom tijekom dva dana. Ako se postupak tako stupnjuje, u jednom danu treba obraditi jednu polovinu životinja po tretiranoj skupini.

56. Nakon nekropsije trupla treba uništiti na odgovarajući način.

IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

57. Podatke treba navesti pojedinačno (tj. tjelesnu masu, masu pomoćnih spolnih tkiva, opcionalna mjerenja i druge reakcije i opažanja) te za svaku skupinu životinja (srednju vrijednost i standardne devijacije svih provedenih mjerenja). Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku. Podaci trebaju prikazivati broj životinja na početku testa, broj životinja koje su tijekom testa uginule ili pokazivale znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme njihove pojave, trajanje i masu.

58. Konačno izvješće treba obuhvaćati sljedeće podatke:

Objekt u kojem se provodi ispitivanje

— naziv objekta, lokacija,

— voditelj ispitivanja i drugo osoblje sa zaduženjima,

— datum početka i završetka studije, tj. prvi dan primjene ispitivane kemikalije odnosno zadnji dan nekropsije.

Ispitivana kemikalija

— podrijetlo, broj lota/serije, identifikacijski podaci, čistoća, puna adresa dobavljača i karakterizacija ispitivane kemikalije ili kemikalija,

— fizikalna priroda i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva,

— uvjeti skladištenja i metoda i učestalost pripreme razrjeđenja,

— svi dobiveni podaci o stabilnosti,

— sve analize dozirnih otopina/suspenzija.

▼**M5**

Nosač

— karakterizacija nosača (identifikacijski podaci, dobavljač i broj serije),

— obrazloženje za odabir nosača (ako se ne radi o vodi).

Pokusne životinje i postupci držanja životinja

— upotrijebljena vrsta/soj i obrazloženje za odabir,

— podrijetlo ili dobavljač životinja, uključujući punu adresu,

— broj i dob isporučenih životinja,

— uvjeti držanja (temperatura, osvjetljenje itd.),

— prehrana (naziv, vrsta, dobavljač, broj serije, sadržaj ako je poznat, sadržaj fitoestrogena),

— stelja (naziv, vrsta, dobavljač, sastav),

— uvjeti držanja u kavezima i broj životinja po kavezu.

Uvjeti testa

— dob kod kastracije i trajanje aklimatizacije nakon kastracije,

— pojedinačna masa životinja na početku studije (s točnošću od 0,1 g),

— postupak randomizacije i evidencija raspodjele u skupne koje primaju nosač, referentnu tvar i ispitivanu kemikaliju te raspodjele u kaveze,

— srednja vrijednost i standardna devijacija tjelesne mase za svaku skupinu i svaki dan kada je vršeno vaganje tijekom cijele studije,

— obrazloženje za odabir doze,

— način primjene ispitivane kemikalije i obrazloženje za izbor načina izlaganja,

— ako je provođen test antiandrogenosti, tretman TP-om (doza i volumen),

— tretman ispitivanom kemikalijom (doza i volumen),

— vrijeme doziranja,

— postupci nekropsije, uključujući način eksangvinacije i anestezije,

— ako su provođene analize u serumu, treba navesti pojedinosti o metodi. Na primjer, ako se koristi RIA, treba navesti postupak RIA, podrijetlo kompleta za RIA, datume isteka valjanosti kompleta, postupak brojanja scintilacijskim brojačem i standardizaciju.

Rezultati

— svakodnevna opažanja za svaku životinju tijekom primjene doza, uključujući:

— tjelesnu masu (s točnošću od 0,1 g),

— kliničke znakove (ako ih je bilo),

— sva mjerenja ili bilješke o potrošnji hrane,

— opažanja kod nekropsije za svaku životinju, uključujući:

▼M5

— datum nekropsije,

— ispitnu skupinu iz koje je životinja,

— identifikacijske podatke o životinji,

— osobu koja je obavila disekciju,

— vrijeme u danu kada je provedena nekropsija i disekcija,

— dob životinje,

— konačnu tjelesnu masu kod nekropsije, uz navođenje svih statistički značajnih povećanja ili smanjenja,

— redoslijed eksangvinacije i disekcije životinja kod nekropsije,

— masu pet ciljnih tkiva ovisnih o androgenima:

— ventralne prostate (s točnošću od 0,1 mg),

— sjemenih vezikula uključujući koagulirajuće žlijezde, uključujući tekućinu (u paru, s točnošću od 0,1 mg),

— kompleksa levator ani plus bulbokavernozni mišić (s točnošću od 0,1 mg),

— Cowperove žlijezde (svježe izvagane – u paru, s točnošću od 0,1 mg),

— glansa penisa (svježe izvagan s točnošću od 0,1 mg),

— masu opcionalnih tkiva, ako se mjerenje provodi:

— jetara (s točnošću od 0,1 g),

— bubrega (u paru, s točnošću od 0,1 mg),

— nadbubrežnih žlijezda (u paru, s točnošću od 0,1 mg),

— opće napomene i komentare,

— analize hormona u serumu, ako se provode,

  — LH u serumu (opcionalno – ng po ml seruma),

  — T u serumu (opcionalno – ng po ml seruma),

— opće napomene i komentare.

Sažeti prikaz podataka

Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku navodeći veličinu uzorka za svaku skupinu, srednju vrijednost i standardnu pogrešku srednje vrijednosti ili standardnu devijaciju. U tablicama treba biti uključena tjelesna masa kod nekropsije, promjene tjelesne mase od početka primjene doza do nekropsije, masa ciljnih pomoćnih spolnih tkiva i sve mase opcionalnih organa.

Diskusija rezultata

Analiza rezultata

59. Treba provesti statističku analizu tjelesne mase i mase organa kod nekropsije u pogledu karakteristika kao što je homogenost varijance uz odgovarajuću transformaciju podataka po potrebi. Tretirane skupine treba usporediti s kontrolnom skupinom upotrebom tehnika kao što je ANOVA nakon koje se provodi usporedba u parovima (npr. Dunnettov jednostrani test) i kriterij za statističku razliku, na primjer, $p \leq 0,05$. Treba identificirati skupine koje postižu statističku značajnost. Međutim, treba izbjegavati „relativne mase organa” zbog nevaljanih statističkih pretpostavki na kojima se temelji takvo manipuliranje podacima.

▼**M5**

60. Za ispitivanje agonizma androgena kontrola treba biti skupina koja je primala samo nosač. Način karakteristike djelovanja ispitne kemikalije može dovesti do različitih relativnih reakcija među tkivima, na primjer trenbolon, koji se ne može reducirati 5 alfa-inhibitorima, ima izraženije učinke na LABC i GP nego TP. Statistički značajno povećanje ($p \leq 0,05$) mase bilo koja dva ili više od pet ciljnih tkiva ovisnih o androgenima (VP, LABC, GP, CG i SVCG) treba smatrati pozitivnim rezultatom androgenog agonista, a sva ciljna tkiva trebala bi pokazivati određeni stupanj povećanog rasta. Kombinirana procjena reakcije svih tkiva pomoćnih spolnih organa (ASO) može se postići upotrebom odgovarajuće multivarijacijske analize podataka. To može poboljšati analizu, posebno u slučajevima kada samo jedno tkivo daje statistički značajnu reakciju.

61. Za ispitivanje antagonizma androgena kontrola treba biti referentna ispitna skupina koja je primala androgen (samo testosteron propionat). Način karakteristike djelovanja ispitne kemikalije može dovesti do različitih relativnih reakcija među tkivima, na primjer inhibitori 5 α-reduktaze, kao što je finasterid, imaju izrazitije učinke na ventralnu prostatu nego na druga tkiva u usporedbi sa snažnim AR antagonistima, kao što je flutamid. Statistički značajno smanjenje ($p \leq 0,05$) mase bilo koja dva ili više od pet ciljnih tkiva ovisnih o androgenima (VP, LABC, GP, CG i SVCG) u vezi s tretmanom samo TP-om treba smatrati pozitivnim rezultatom androgenog antagonista, a sva ciljna tkiva trebala bi pokazivati određeni stupanj smanjenog rasta. Kombinirana procjena reakcije svih ASO tkiva može se postići upotrebom odgovarajuće multivarijacijske analize podataka. To može poboljšati analizu, posebno u slučajevima kada samo jedno tkivo daje statistički značajnu reakciju.

62. Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku koji uključuje srednju vrijednost, standardnu pogrešku srednje vrijednosti (standardna devijacija isto bi bila prihvatljiva) i veličinu uzorka za svaku skupinu. Treba uključiti i tablice s pojedinačnim podacima. Treba ispitati pojedinačne vrijednosti, srednju vrijednost, vrijednosti SE-a (SD-a) i CV-a za kontrolne podatke kako bi se utvrdilo zadovoljavaju li kriterije prihvatljivosti za sukladnost s očekivanim povijesnim vrijednostima. Na temelju CV-a koji premašuju vrijednosti CV-a navedene u tablici 1. (vidjeti stavke 25. i 26.) za svaku masu organa treba utvrditi postoje li pogreške u bilježenju ili unosu podataka ili postoji li mogućnost da laboratorij još nije ovladao preciznom disekcijom tkiva ovisnih o androgenima te je potrebna dodatna obuka/praksa. Općenito, CV-ovi (standardna devijacija podijeljena sa srednjom masom organa) su reproducibilni od laboratorija do laboratorija i od studije do studije. Prikazani podaci trebali bi uključivati najmanje: ventralnu prostatu, sjemeni vezikul, levator ani plus bulbokavernozni mišić, Cowperove žlijezde, glans penis, jetra te tjelesnu masu i promjenu tjelesne mase od početka primjene doza do nekropsije. Podaci se mogu prikazati i nakon podešavanja kovarijance tjelesne mase, ali to ne smije zamijeniti prikazivanje nepodešenih podataka. Osim toga, ako ne dođe do razdvajanja prepucija (PPS) ni u jednoj od skupina, treba zabilježiti učestalost PPS-a i statistički usporediti s kontrolnom skupinom korištenjem Fisherova egzaktnog testa.

▼**M5**

63. Pri provjeri točnosti računalno unesenih podataka s originalno zapisanim podacima treba pažljivo proučiti vrijednosti mase organa koje nisu biološki vjerojatne ili variraju više od tri standardne devijacije od srednjih vrijednosti tretiranih skupina te će ih možda biti potrebno odbaciti, s obzirom na to da su to vjerojatno pogreške nastale tijekom bilježenja.

64. Usporedba rezultata studije s vrijednostima CV-a OECD-a (u tablici 1.) često je važan korak u interpretaciji valjanosti rezultata studije. U laboratoriju treba čuvati povijesne podatke za kontrolne skupine koje su primale nosač. U laboratoriju treba čuvati i povijesne podatke za reakcije za pozitivne referentne kemikalije, kao što su TP i FT. Laboratoriji mogu i periodično ispitivati reakciju na poznate slabe androgene agoniste i antagoniste i čuvati te podatke. Ti se podaci mogu usporediti s raspoloživim podacima OECD-a kako bi se zajamčilo da metode upotrijebljene u laboratoriju osiguravaju dovoljnu statističku preciznost i snagu.

▼**M5**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Androgen je termin koji se upotrebljava za opisivanje pozitivnog utjecaja na rast tkiva ovisnih o androgenima

Antiandrogen znači sposobnost kemikalije da blokira djelovanje TP-a u organizmu sisavaca.

Kemikalija znači tvar ili mješavina.

Datum okota znači postnatalni dan 0.

Doza znači količina primijenjene ispitivane kemikalije. Kod Hershbergerova biotesta doza se izražava kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitivane životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase/dnevno).

Doziranje je općeniti termin koji obuhvaća dozu, učestalost i trajanje doziranja.

Na umoru je termin koji se upotrebljava za opisivanje životinje u stanju ugibanja, tj. blizu trenutka uginuća.

Postnatalni dan X znači X-ti dan života nakon dana okota.

Osjetljivost znači sposobnost ispitne metode da točno identificira kemikalije koje imaju svojstvo na koje se ispituju.

Specifičnost znači sposobnost ispitne metode da točno identificira kemikalije koje nemaju svojstvo na koje se ispituju.

Ispitivana kemikalija znači svaka tvar ili mješavina koja se ispituje upotrebom ove ispitne metode.

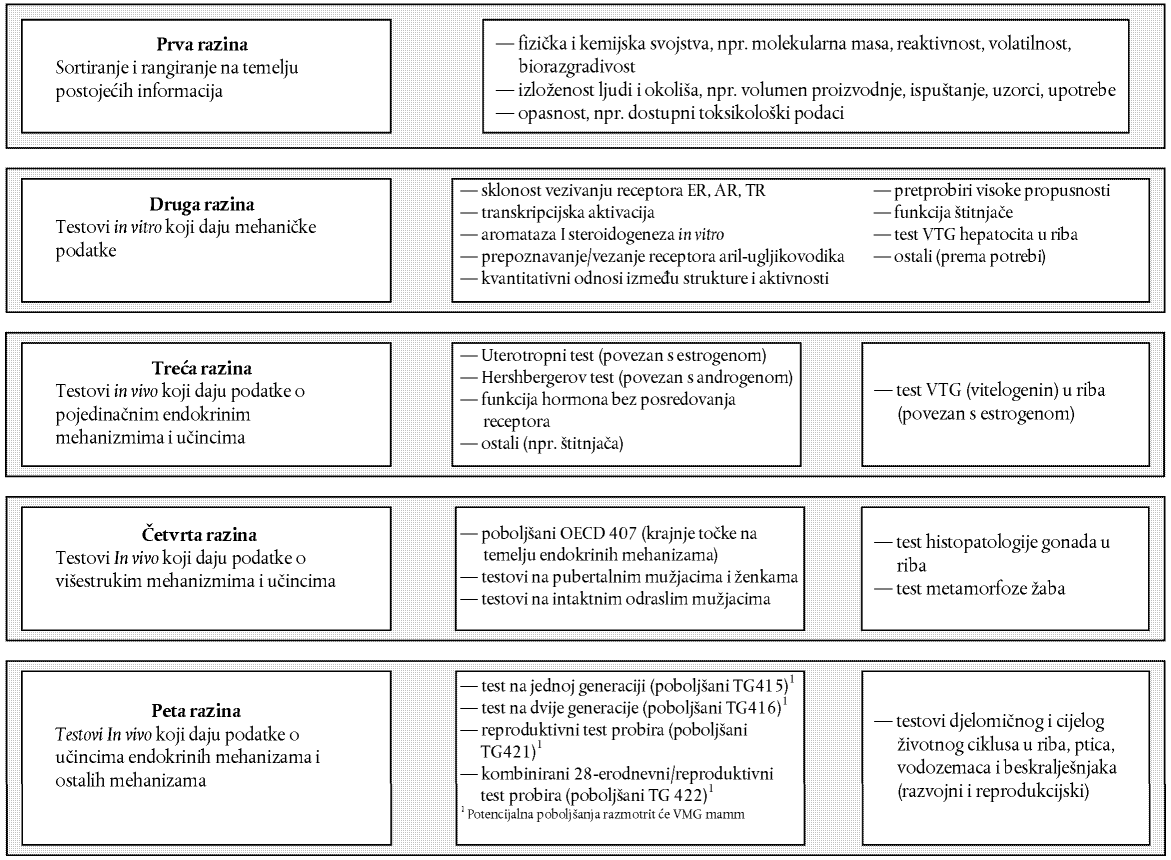
Validacija je znanstveni postupak koji ima za cilj karakterizaciju operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te dokazivanja pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

▼M5

Dodatak 2.

Napomena: Dokument pripremilo tajništvo Programa smjernica za ispitivanje na temelju sporazuma postignutog na šestom sastanku radne skupine za ispitivanje i procjenu endokrinih disruptora

OECD–ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija



VMG mamm: Skupina za upravljanje validacijama ispitivanja i ocjenjivanja na sisavcima

02008R0440 — HR — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NAPOMENE UZ OKVIR

Napomena 1.: Moguć je ulazak na svim razinama i izlazak na svim razinama što ovisi o prirodi potreba za postojećim informacijama u svrhe procjene opasnosti i rizika

Napomena 2.: Na Razini 5., ekotoksikologija bi trebala obuhvaćati krajnje točke koje upućuju na mehanizme štetnih učinaka i potencijalnu štetu za populaciju

Napomena 3.: Kada multimodalni model obuhvaća nekoliko testova s jednom krajnjom točkom, taj bi model zamijenio upotrebu tih testova s jednom krajnjom točkom

Napomena 4.: Ocjenjivanje svake kemikalije trebalo bi se temeljiti na pristupu ovisnom o pojedinom slučaju, uzimajući u obzir sve raspoložive informacije, imajući na umu funkciju razina okvira.

Napomena 5.: Okvir trenutačno ne treba smatrati sveobuhvatnim. Na razinama 3., 4. i 5. on obuhvaća testove koji su ili na raspolaganju ili za koje je validacija u tijeku. U pogledu ovih drugih, oni su uključeni privremeno. Nakon što budu razvijeni i validirani bit će formalno dodani u okvir.

Napomena 6.: Ne treba smatrati da razina 5. obuhvaća samo definitivne testove. Smatra se da testovi uključeni na toj razini doprinose općoj procjeni opasnosti i rizika.

LITERATURA

(1) OECD (1998.). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. ožujka 1998., ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962.). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005.). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: Current Protocols in Toxicology 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006.). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008.). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007.). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006.). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265. – 1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007.). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671. – 8.

(9) Korenchevsky V (1932.). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J 26:413. – 422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932.). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J 26:1306. – 1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950.). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38. – 44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949.). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113. – 119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953.). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175. – 180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964.). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969.). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151. – 220.

(16) Massaro EJ (2002.). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, str. 38.

(17) OECD (2000.). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982.). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Pariz.

(19) OECD (2008.). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001.). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006.). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265. – 1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OECD (2008.). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008.). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009.). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (SL L 276, 20.10.2010., str. 33.).

(27) Sljedeća poglavlja ovog Priloga:

B.1.A, Akutna oralna toksičnost – postupak s fiksnom dozom

B.1.B, Akutna oralna toksičnost – metoda klase akutne toksičnosti

▼M5

B.56. **PRODULJENA STUDIJA REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA JEDNOJ GENERACIJI**

UVOD

1. Ova ispitna metoda istovjetna je Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 443 (2012.). Temelji se na prijedlogu Tehničkog odbora za ocjenu sigurnosti poljoprivrednih kemikalija (ACSA) Instituta za znanosti o zdravlju i okolišu (HESI) Međunarodnog instituta za znanost o životu (ILSI) za produljenu studiju reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji za životnu fazu F_1 kako je objavljena u Cooper et al., 2006. (1). U dizajn studije uneseno je nekoliko poboljšanja i pojašnjenja kako bi se osigurala fleksibilnost i naglasila važnost započinjanja s postojećim spoznajama uz upotrebu opažanja uživo radi usmjeravanja i prilagodbe ispitivanja. Ovom se ispitnom metodom pruža detaljan opis operativne provedbe produljene studije reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji. Ovom se ispitnom metodom opisuju tri kohorte životinja F_1:

1. kohorta: procjenjuju se reproduktivne/razvojne krajnje točke; ova se kohorta može produljiti kako bi uključivala generaciju F_2,

2. kohorta: procjenjuje se mogući učinak izloženosti kemikaliji na živčani sustav u razvoju,

3. kohorta: procjenjuje se mogući učinak izloženosti kemikaliji na imunološki sustav u razvoju.

2. Odluke o procjenjivanju druge generacije i ispuštanju kohorte za razvojnu neurotoksičnost i/ili kohorte za razvojnu imunotoksičnost trebale bi odražavati postojeće spoznaje o kemikaliji koja se vrednuje, kao i potrebe različitih regulatornih tijela. Svrha je ove ispitne metode pružiti informacije o načinu na koji se studija može provoditi te načinu na koji treba vrednovati svaku kohortu.

3. Postupak odlučivanja o internim okidačima za proizvodnju 2. generacije opisuje se u OECD-ovoj Smjernici 117 (39) za ona regulatorna tijela koja ih upotrebljavaju.

Početna razmatranja i ciljevi

4. Glavni je cilj produljene studije reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji vrednovanje specifičnih životnih faza koje nisu obuhvaćene ostalim vrstama studija toksičnosti te ispitivanje učinaka koji mogu nastati kao posljedica prenatalne i postnatalne izloženosti kemikaliji. Kod reproduktivnih krajnjih točaka za otkrivanje učinaka na reproduktivne organe u mužjaka i ženki predviđa se, kao prvi korak te prema dostupnosti, upotreba informacija iz studija s ponovljenim dozama (uključujući studije probira reproduktivne toksičnosti, npr. OECD-ova Smjernica za ispitivanje 422 (32)), ili kratkoročnih testova probira endokrinih disruptora (npr. uterotropni biotest – ispitna metoda B.54. (36) te Hershbergerova testa – ispitna metoda B.55. (37)). To može uključivati spermatogenezu (histopatologiju testisa) u mužjaka te cikluse estrusa, broj folikula/sazrijevanje jajnih stanica i integritet jajnika (histopatologiju) u ženki. Produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji tada služi kao test za reproduktivne krajnje točke za koje je potrebna interakcija mužjaka i ženki, ženki sa zamecima te ženki s potomcima i generacije F_1 do završetka spolnog sazrijevanja (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 151 kojom se potvrđuje ova ispitna metoda (40)).

▼M5

5. Ova je ispitna metoda namijenjena vrednovanju prenatalnih i postnatalnih učinaka kemikalija na razvoj, kao i temeljitom vrednovanju sistemske toksičnosti u ženki koje su skotne i koje doje te u mladih i odraslih potomaka. Očekuje se da će se detaljnim pregledom ključnih razvojnih krajnjih točaka, poput preživljavanja potomaka, neonatalnog zdravlja, razvojnog statusa pri okotu te fizičkog i funkcionalnog razvoja do odrasle dobi, utvrditi specifični ciljni organi u potomaka. Osim toga, studija će pružiti i/ili potvrditi informacije o učincima ispitivane kemikalije na integritet i funkcioniranje reproduktivnih sustava odraslih mužjaka i ženki. Točnije, ali ne isključivo, razmatraju se sljedeći parametri: funkcija gonada, ciklus estrusa, sazrijevanje sperme iz epididimisa, ponašanje prilikom parenja, začeće, skotnost, parturicija i laktacija. Nadalje, s pomoću informacija iz procjena razvojne neurotoksičnosti i razvojne imunotoksičnosti karakterizirat će se mogući učinci u tim sustavima. Podacima iz tih ispitivanja trebalo bi omogućiti utvrđivanje visine doze kod koje se ne uočava štetni učinak (NOAEL), visine doze kod koje se uočava najslabiji učinak (LOAEL) i/ili referentnih doza za različite krajnje točke i/ili ih treba upotrebljavati za karakterizaciju učinaka otkrivenih u ranijim studijama s ponovljenim dozama i/ili bi oni trebali služiti kao smjernica za naknadno ispitivanje.

6. Shematski prikaz protokola prikazan je na slici 1. Ispitivana kemikalija primjenjuje se stalno u graduiranim dozama na nekoliko skupina spolno zrelih mužjaka i ženki. Toj roditeljskoj (P) generaciji doza se daje tijekom određenog razdoblja prije parenja (odabir na temelju dostupnih informacija za ispitivanu kemikaliju, ali najmanje dva tjedna) i tijekom dva tjedna razdoblja parenja. Mužjaci P dalje se tretiraju najmanje do odbijanja od sise generacije F_1. Njih treba tretirati najmanje 10 tjedana. Njih je moguće i dulje tretirati ako postoji potreba za pojašnjenjem učinaka na reprodukciju. Tretman ženki P nastavlja se tijekom graviditeta i laktacije do usmrćenja nakon odbijanja njihovih legala od sise (odnosno 8 – 10 tjedana tretmana). Potomci F_1 nastavljaju se tretirati ispitivanom kemikalijom od odbijanja od sise do odrasle dobi. Ako se procjenjuje druga generacija (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 117 (39)), potomci F_1 ostat će u tretmanu do odbijanja generacije F_2 ili do završetka studije.

7. Na svim životinjama provode se klinička opažanja i patološka ispitivanja kako bi se utvrdili znakovi toksičnosti s posebnim naglaskom na integritet i funkcioniranje muških i ženskih reproduktivnih sustava kao i zdravlje, rast, razvoj i funkciju potomstva. Kod odbijanja od sise odabrani potomci raspoređuju se u posebne podskupine (kohorte 1. – 3., vidjeti stavke 33. i 34. i sliku 1.) radi daljnjih ispitivanja, uključujući spolno sazrijevanje, integritet i funkcioniranje reproduktivnih organa, neurološke i bihevioralne krajnje točke i imunološke funkcije.

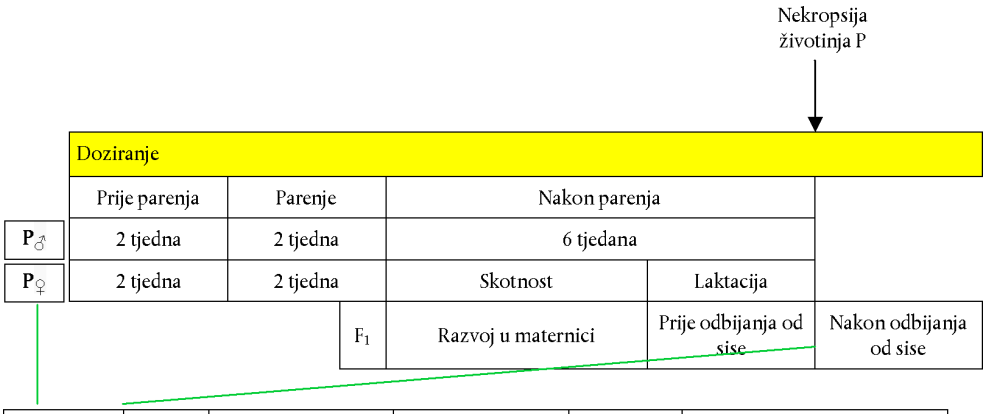
8. Pri provođenju studije treba slijediti opća načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (34).

▼M5

9. Kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija, ispitna metoda će se revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu.

Slika 1.

Shema produljene studije reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji



Roditeljska generacija	Kohorta	Oznaka	Životinje/kohorta	Spolna zrelost	Približna starost pri nekropsiji (u tjednima)
Cilj je 20 legala po skupini	1A	Za razmnožavanje	20 M + 20 Ž	Da	13
	1B	Za razmnožavanje	20 M + 20 Ž	Da	14 ili 20 - 25 ako je započeta
	2A	Neurotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Da	11-12
	2B	Neurotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Ne	3
	3	Imunotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Da	8
	Višak	Pričuva		Ne	3

@ jedna po leglu i, gdje je to moguće, reprezentativno za ukupno 20 legala

OPIS METODE/PRIPREMA ZA ISPITIVANJE

Životinje

Odabir vrsta i soja životinja

10. Odabir vrste za ispitivanje reproduktivne toksičnosti treba pomnjivo razmotriti s obzirom na sve dostupne podatke. Međutim, zbog količine podataka i mogućnosti usporedbe s ispitivanjem opće toksičnosti, štakor je u pravilu poželjna vrsta te se kriteriji i preporuke u ovoj ispitnoj metodi odnose na tu vrstu. Ako se upotrebljavaju druge vrste, treba navesti obrazloženje, a bit će potrebne i primjerene modifikacije protokola. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti spontanih razvojnih defekata ne bi trebalo upotrebljavati.

Starost, tjelesna masa i kriterij uključivanja

11. Treba upotrebljavati zdrave roditeljske životinje koje nisu sudjelovale u ranijim pokusima. Treba proučavati mužjake i ženke koje još nisu imale potomstvo i koje nisu skotne. Životinje P trebale bi biti spolno zrele, jednake mase (po spolu) na početku doziranja, slične starosti (približno 90 dana) kod parenja te bi trebale predstavljati vrstu i soj koji se ispituju. Aklimatizacija životinja treba trajati najmanje 5 dana od dolaska. Životinje se nasumično raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje tako da srednje vrijednosti tjelesne mase skupina (npr. ± 20 % srednje vrijednosti) budu usporedive.

▼**M5**

Uvjeti smještaja i hranjenja

12. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Relativna vlažnost treba biti između 30 % i 70 %, uz idealni raspon od 50 % do 60 %. Raspored umjetnog svjetla treba biti 12 sati svjetla, 12 sati tame. Može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine vode za piće. Treba paziti na udio fitoestrogena u prehrani s obzirom na to da visoka razina fitoestrogena u prehrani može utjecati na neke reproduktivne krajnje točke. Preporučuje se standardizirana prehrana poznate formule sa smanjenim estrogenskim kemikalijama. Na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije ako se ona daje u hrani. Treba potvrditi sadržaj, homogenost i stabilnost ispitivane kemikalije u prehrani. Hranu i vodu za piće treba redovno analizirati s obzirom na kontaminante. Uzorke svake serije hrane upotrijebljene tijekom studije treba sačuvati u odgovarajućim uvjetima (npr. zamrznute na – 20 °C) do dovršetka izvješća u slučaju da je zbog rezultata potrebna daljnja analiza sastava hrane.

13. Životinje treba smjestiti u kaveze u malim skupinama istog spola i skupine za tretiranje. Životinje se mogu smjestiti pojedinačno kako bi se izbjegle moguće ozljede (npr. mužjaci nakon razdoblja parenja). Postupci parenja trebali bi se odvijati u odgovarajućim kavezima. Nakon što je došlo do kopulacije, ženke koje se smatra skotnima smještа se odvojeno u kaveze za okot ili materinstvo gdje im je osiguran odgovarajući i utvrđeni materijal za pravljenje gnijezda. Legla se smještа s majkama do odbijanja od sise. Životinje F_1 treba smjestiti u male skupine istog spola i skupine za tretiranje od odbijanja od sise do završetka studije. Životinje se mogu zasebno smjestiti ako je to znanstveno opravdano. Razina fitoestrogena u odabranoj stelji treba biti minimalna.

Broj i identifikacija životinja

14. U pravilu bi se u svakoj ispitnoj i kontrolnoj skupini trebao nalaziti dovoljan broj parova koji će se pariti kako bi se dobilo najmanje 20 skotnih ženki po skupini za doziranje. Cilj je dobiti dovoljno skotnih životinja kako bi se osigurala valjana procjena potencijala kemikalije da utječe na plodnost, skotnost i ponašanje majki životinja generacije P te na rast i razvoj potomstva F_1 od začeća do sazrijevanja. Studija nije nužno nevaljana zbog neuspjeha u dobivanju željenog broja skotnih životinja, što treba vrednovati od slučaja do slučaja uzimajući u obzir mogući uzročno-posljedični odnos s ispitivanom kemikalijom.

15. Prije početka doziranja svakoj životinji P dodjeljuje se jedinstveni identifikacijski broj. Ako je iz povijesnih podataka laboratorija vidljivo da je moguće da u znatnog broja ženki nema redovnih (četverodnevnih ili peterodnevnih) ciklusa estrusa, prije početka tretmana preporučuje se njihova procjena. Alternativno, veličina skupine može se povećati kako bi se osiguralo da na početku tretmana najmanje 20 ženki u svakoj skupini ima redovne (četverodnevne ili peterodnevne) cikluse estrusa. Svi potomci F_1 pri prvom pregledu nultog ili 1. postnatalnog dana dobivaju jedinstvenu identifikaciju. Tijekom studije treba voditi evidenciju o leglu podrijetla za sve životinje F_1, a za životinje F_2 prema potrebi.

▼M5

Ispitivana kemikalija

Dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji

16. Revizija postojećih informacija važna je za donošenje odluke o putu primjene, odabiru nosača, odabiru životinjske vrste, odabiru doza i mogućoj izmjeni rasporeda doziranja. Zato kod planiranja produljene studije reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji treba uzeti u obzir sve relevantne dostupne informacije o ispitivanoj kemikaliji, odnosno fizikalno-kemijska, toksikokinetička (uključujući metabolizam specifičan za vrstu), toksikodinamička obilježja, odnose između strukture i aktivnosti, metaboličke postupke in vitro, rezultate ranijih studija toksičnosti i relevantne informacije o strukturalnim analogijama. Privremene informacije o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji (ADME) te bioakumulaciji moguće je izvesti iz kemijske strukture, fizikalno-kemijskih podataka, raspona vezivanja na proteine plazme ili toksikokinetičkih studija, dok rezultati studija toksičnosti pružaju dodatne informacije, npr. o vrijednostima pri kojima nisu uočeni štetni učinci, metabolizmu ili indukciji metabolizma.

Razmatranje toksikokinetičkih podataka

17. Iako nisu obvezni, toksikokinetički podaci iz ranijih studija za određivanje raspona doze ili ostalih studija iznimno su korisni kod planiranja dizajna studije, odabira visina doze i tumačenja rezultata. Osobito su korisni podaci kojima: 1. se provjerava izloženost ispitivanoj kemikaliji (ili relevantnim metabolitima) fetusa u razvoju i mladunaca, 2. se osigurava procjena interne dozimetrije te 3. se procjenjuje moguća zasićenost kinetičkih postupaka koja ovisi o dozi. Treba razmotriti i dodatne toksikokinetičke podatke, poput profila metabolita, vremenskih tijekova koncentracije itd., ako su dostupni. Tijekom glavne studije mogu se prikupljati i dopunski toksikokinetički podaci ako se time ne ometa prikupljanje i tumačenje krajnjih točaka glavne studije.

Opća je uputa da bi sljedeći skup toksikokinetičkih podataka bio koristan pri planiranju produljene studije reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji:

— kasni graviditet (npr. 20. gestacijski dan) – krv majke i krv fetusa,

— središnje razdoblje laktacije (10. PND) – krv majke, krv mladunca i/ili mlijeko,

— rano razdoblje nakon odbijanja od sise (npr. 28. PND) – uzorci krvi životinja koje se odbijaju od sise.

Pri utvrđivanju određenih analita (npr. roditeljska kemikalija i/ili metaboliti) i sheme uzorkovanja treba biti fleksibilan. Primjerice, broj uzoraka i vrijeme prikupljanja u određenom danu kad se provodi uzorkovanje ovisit će o putu izloženosti i ranijim spoznajama o toksikokinetičkim obilježjima u životinja koje nisu skotne. Kod studija u kojima se primjenjuje normalno hranjenje dovoljno je jedno uzorkovanje u isto vrijeme svih dana, dok prilikom doziranja sondom može biti potrebno više vremena uzorkovanja radi bolje procjene raspona internih doza. Međutim, nije potrebno generirati cijeli vremenski tijek koncentracije bilo kojeg dana uzorkovanja. Po potrebi krv je moguće izvaditi po spolu unutar legala radi analiza fetusa i životinja koje su tek okoćene.

▼M5

Put primjene

18. Odabirom puta primjene treba uzeti u obzir putove koji su najrelevantniji za izlaganje ljudi. Iako je dizajniran za primjenu ispitivane kemikalije hranom, protokol se može mijenjati za primjenu drugim putevima (voda za piće, sonda, inhalacija, dermalno) ovisno o karakteristikama kemikalije i potrebnih informacija.

Odabir nosača

19. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Preporučuje se, po mogućnosti, prvo razmotriti upotrebu vodene otopine/suspenzije, a zatim otopine/suspenzije u ulju (npr. kukuruznom ulju). Za sve druge nosače osim vode treba poznavati toksične karakteristike nosača. Treba izbjegavati upotrebu nosača koji mogu biti intrinzično toksični (npr. aceton, DMSO). Treba utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije u nosaču. Ako se za doziranje upotrebljava nosač ili drugi aditiv, treba uzeti u obzir sljedeće karakteristike: učinke na apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili zadržavanje ispitivane kemikalije, učinke na kemijska svojstva ispitivane kemikalije koji mogu izmijeniti njezina toksična obilježja te učinke na unos hrane i vode ili nutritivni status životinja.

Odabir doze

20. U pravilu bi studija trebala uključivati najmanje tri visine doze i usporednu kontrolu. Pri odabiru odgovarajućih visina doze istraživač bi trebao razmotriti sve dostupne informacije, uključujući informacije o doziranju iz ranijih studija, toksikokinetičke podatke o životinjama koje su skotne i koje nisu skotne, opseg laktacijskog transfera te procjene o izlaganju ljudi. Ako su dostupni toksikokinetički podaci koji ukazuju na zasićenost toksikokinetičkih postupaka koja ovisi o dozi, treba izbjegavati visoke doze kod kojih se zasićenost jasno uočava, naravno uz uvjet da se očekuje da su izlaganja ljudi znatno ispod točke zasićenosti. U takvim bi slučajevima najviša doza za tranziciju u nelinearno toksikokinetičko ponašanje trebala biti u točki infleksije ili neznatno iznad nje.

21. U izostanku relevantnih toksikokinetičkih podataka visine doza trebale bi se temeljiti na toksičnim učincima, osim ako su ograničene fizičkom ili kemijskom prirodom kemikalije. Ako se visine doza temelje na toksičnosti, najvišu dozu treba odabrati s ciljem izazivanja određene sistemske toksičnosti, ali ne smrti ili teške patnje životinja.

22. Treba odabrati niz sve nižih doza kako bi se dokazali svi učinci povezani s dozom te utvrdile vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci ili doze blizu granice otkrivanja s pomoću kojih bi se izračunala referentna doza za najosjetljivije krajnje točke. Dvostruki ili četverostruki intervali često su optimalni za izbjegavanje velikog raspona doza između vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci i vrijednosti kod kojih je uočena najniža razina štetnog učinka. Često je dodavanje četvrte ispitne skupine poželjnije od upotrebe vrlo velikog intervala (npr. većeg od faktora 10) između doza.

23. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnim skupinama postupa se jednako kao sa životinjama u ispitnoj skupini. Ta bi skupina trebala biti netretirana ili placebo kontrolna skupina ili kontrolna skupina tretirana samo nosačem, ako se kod primjene ispitivane kemikalije upotrebljava nosač. Ako se upotrebljava nosač, kontrolna bi ga skupina trebala primiti u najvećem volumenu koji je upotrijebljen.

▼M5

Ispitivanje granice

24. Ako nema dokaza o toksičnosti kod doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan u studijama s ponovljenim dozama ili ako toksičnost ne treba očekivati na temelju podataka o kemikalijama koje su strukturno i/ili metabolički povezane, kojima se ukazuje na sličnost u metaboličkim obilježjima in vivo/in vitro, nije potrebna studija u kojoj se upotrebljava nekoliko visina doza. U takvim bi se slučajevima produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji mogla provesti s pomoću kontrolne skupine i jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan. Međutim, ako se pri toj ograničenoj dozi pronađu dokazi reproduktivne ili razvojne toksičnosti, za utvrđivanje vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci bit će potrebne daljnje studije s nižim dozama. Ta se razmatranja u pogledu ispitivanja granice primjenjuju samo ako izlaganje ljudi ne ukazuje na potrebu za višom dozom.

POSTUPCI

Izlaganje potomaka

25. Izlaganje hranom poželjan je način primjene. Ako se provode studije u kojima se primjenjuje hranjenje na sondu, treba napomenuti da će mladunci u pravilu ispitnu kemikaliju primati samo posredno, u mlijeku, sve dok za njih ne započne izravno doziranje nakon odbijanja od sise. Kod studija u kojima se tvar daje u hrani ili vodi za piće, mladunci će dodatno primati ispitivanu kemikaliju izravno kad sami počnu jesti tijekom posljednjeg tjedna razdoblja laktacije. Izmjene dizajna studije treba razmotriti ako je izlučivanje ispitivane kemikalije mlijekom slabo i ako nema dokaza za neprekidno izlaganje potomaka. U tim slučajevima treba razmotriti izravno doziranje mladuncima tijekom razdoblja laktacije na temelju dostupnih toksikokinetičkih informacija, toksičnosti u potomaka ili promjena u biomarkerima (3)(4). Prije provođenja studija s izravnim doziranjem na mladuncima koji sisaju (5) treba pomnjivo razmotriti koristi i nedostatke.

Raspored doziranja i primjena doza

26. U prethodnim studijama toksičnosti s ponovljenim dozama odgovarajućeg trajanja mogu se pronaći neke informacije o ciklusu estrusa, histopatologiji reproduktivnog trakta u mužjaka i ženki i analizi sperme iz testisa/epididimisa. Trajanje tretmana prije parenja u ponovljenoj studiji reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji zato je usmjereno na otkrivanje učinaka na funkcionalne promjene koje mogu ometati ponašanje kod parenja i fertilizacije. Tretman prije parenja treba trajati dovoljno dugo kako bi se postigli stabilni uvjeti izlaganja u mužjaka i ženki P. U većini se slučajeva dvotjedni tretman prije parenja smatra odgovarajućim u oba spola. U ženki on uključuje 3 do 4 cjelovita ciklusa estrusa i trebao bi biti dovoljan za otkrivanje svih štetnih učinaka na njih. U mužjaka on je ekvivalentan vremenu potrebnome za prijenos spermija u sazrijevanju iz epididimisa te bi se njime trebalo omogućiti otkrivanje posttesikularnih učinaka na spermu (tijekom posljednjih faza spermijacije i sazrijevanja sperme iz epididimisa) kod parenja. Po usmrćenju, kad su na rasporedu testikularna i epididimalna histopatologija i analiza parametara sperme, mužjaci P i F_1 bit će izloženi najmanje jednom cjelovitom postupku spermatogeneze ((6) (7) (8) (9) i OECD-ova Smjernica 151 (40)).

▼**M5**

27. Izlaganje prije parenja u mužjaka moguće je prilagoditi ako su testikularna toksičnost (ometanje spermatogeneze) ili učinci na integritet i funkcioniranje sperme jasno utvrđeni u ranijim studijama. Isto tako, u ženki se različiti scenariji izlaganja prije parenja mogu obrazložiti poznatim učincima ispitivane kemikalije na ciklus estrusa, a time i na seksualnu osjetljivost. U posebnim je slučajevima moguće prihvatiti da se s tretmanom ženki P započelo isključivo nakon dobivanja brisa pozitivnog na spermu (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 151 (40)).

28. Nakon utvrđivanja razdoblja doziranja prije parenja životinje treba tretirati ispitivanom kemikalijom neprekidno svih 7 dana u tjednu do nekropsije. Doziranje se na sve životinje treba primijeniti na isti način. Doziranje se treba nastaviti tijekom dvotjednog razdoblja parenja, a u ženki P tijekom gestacije i laktacije do dana usmrćenja nakon odbijanja od sise. Mužjake treba tretirati na isti način do usmrćenja u vrijeme kad se životinje F_1 odbijaju od sise. Kod nekropsije prioritet bi trebale imati ženke na kojima nekropsiju treba izvršiti na isti ili sličan dan laktacije. Nekropsija mužjaka može trajati više dana, ovisno o kapacitetima laboratorija. Osim ako je pokrenuto tijekom razdoblja laktacije, izravno doziranje odabranim mužjacima i ženkama F_1 trebalo bi započeti kod odbijanja od sise te bi ga trebalo nastaviti do planirane nekropsije, ovisno o rasporedu kohorti.

29. Pri kemikalijama koje se daju u hrani ili vodi za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije o kojoj se radi nemaju utjecaja na uobičajen unos hrane ili vode. Ako se ispitivana kemikalija daje u hrani, može se upotrebljavati stalna koncentracija u hrani (ppm) ili stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje, a odabir treba obrazložiti.

30. Ako se ispitivana kemikalija primjenjuje sondom, volumen tekućine koja se jednokratno primjenjuje u pravilu ne bi trebao premašivati 1 ml/100 g tjelesne mase (0,4 ml/100 g tjelesne mase maksimum je za ulje poput kukuruzova ulja). Osim kod nadražujućih i nagrizajućih kemikalija, za koje je normalno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena treba podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod svih visina doze osigurao stalni volumen. Tretman bi trebalo davati svakog dana u isto vrijeme. Dozu za svaku životinju u pravilu treba temeljiti na posljednjoj vrijednosti individualne tjelesne mase te prilagođavati najmanje jednom tjedno u odraslih mužjaka i odraslih ženki koje nisu skotne te svaka dva tjedna u skotnih ženki i životinja F_1 ako se primjenjuje ona prije odbijanja od sise i tijekom 2 tjedna od toga. Ako se u toksikokinetičkim podacima ukazuje na niski prijenos ispitivane kemikalije u posteljici, moguće je da dozu koja se primjenjuje sondom tijekom posljednjeg tjedna graviditeta treba prilagoditi kako bi se izbjegla primjena prekomjerno toksične doze na ženku. Ženke na dan parturicije ne treba tretirati sondom ili bilo kojim tretmanom pri kojem je potrebno rukovanje životinjom, a propuštanje primjene ispitivane kemikalije na taj je dan poželjnije od ometanja postupka okota.

▼M5

Parenje

31. Svaku ženku P treba smjestiti s jednim nasumično odabranim, nepovezanim mužjakom iz iste skupine za doziranje (uparivanje 1:1) do kopulacije ili do isteka 2 tjedna. Ako nema dovoljno mužjaka, primjerice zbog smrti mužjaka prije uparivanja, tada se mužjaci koji su se već parili mogu upariti (1:1) s drugim ženkama tako da su sve ženke uparene. Danom graviditeta 0 smatra se dan kad je potvrđeno parenje (nađen je vaginalni čep ili sperma). Životinje treba odvojiti čim prije nakon kopulacije. Ako nakon 2 tjedna nije došlo do parenja, životinje treba odvojiti bez daljnje mogućnosti parenja. Parove koji se pare treba jasno identificirati u podacima.

Veličina legla

32. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem dodatnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi pet mužjaka i pet ženki. Selektivno uklanjanje mladunaca, primjerice prema tjelesnoj masi, nije prihvatljivo. Kad god je broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke).

Odabir mladunaca za studije nakon odbijanja od sise (vidjeti sliku 1.)

33. Pri odbijanju od sise (oko 21. postnatalnog dana) najviše 20 mladunaca iz svih raspoloživih legala po dozi i kontrolnoj skupini bira se za daljnja ispitivanja te čuva do spolnog sazrijevanja (osim ako je potrebno ranije ispitivanje). Mladunci se biraju nasumično, a vidljivo patuljaste životinje (životinje čija je tjelesna masa više od dvije standardne devijacije ispod srednje mase mladunaca iz odgovarajućeg legla) ne treba uključiti jer nije vjerojatno da će one biti reprezentativne za skupinu za tretiranje.

Na 21. postnatalni dan odabrani mladunci F1 nasumično se raspoređuju u jednu od tri kohorte životinja kako slijedi:

1. kohorta (1.A i 1.B) = ispitivanje reproduktivne/razvojne toksičnosti,

2. kohorta (2.A i 2.B) = ispitivanje razvojne neurotoksičnosti,

3. kohorta = ispitivanje razvojne imunotoksičnosti.

1.A kohorta: Jedan mužjak i jedna ženka po leglu po skupini (20 po spolu po skupini): primarni odabir za primarnu procjenu učinaka na reproduktivne sustave i opće toksičnosti.

1.B kohorta: Jedan mužjak i jedna ženka po leglu po skupini (20 po spolu po skupini): primarni odabir za daljnju procjenu reproduktivnog učinka parenjem životinja F_1 kod procjene (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 117 (39)) te za dobivanje dodatnih histopatoloških podataka u slučajevima sumnje na reproduktivne ili endokrine toksične tvari ili ako su rezultati 1.A kohorte dvosmisleni.

2.A kohorta: Ukupno 20 mladunaca po skupini (10 mužjaka i 10 ženki po skupini, jedan mužjak ili jedna ženka po leglu) raspoređuje se za neurobihevioralno ispitivanje, a potom i neurohistopatološku procjenu u odrasloj dobi.

2.B kohorta: Ukupno 20 mladunaca po skupini (10 mužjaka i 10 ženki po skupini, jedan mužjak ili jedna ženka po leglu) raspoređuje se za neurohistopatološku procjenu kod odbijanja od sise (21. ili 22. prenatalni dan). Ako nema dovoljno životinja, poželjno je životinje rasporediti u 2.A kohortu.

▼M5

3. kohorta: Ukupno 20 mladunaca po skupini (10 mužjaka i 10 ženki po skupini, po mogućnosti, jedno po leglu). Dodatni mladunci iz kontrolne skupine mogu biti potrebni kao pozitivne kontrolne životinje u testu reakcije antitijela ovisnih o T-stanicama (TDAR) na 56. ±3 postnatalni dan.

34. Ako u leglu nema dovoljno mladunaca za sve kohorte, 1. kohorta ima prioritet jer se može produljiti radi dobivanja generacije F_2. Dodatni mladunci mogu se rasporediti u bilo koju kohortu u posebnom slučaju, npr. ako se sumnja da je kemikalija neurotoksična, imunotoksična ili reproduktivno toksična. Ti se mladunci mogu upotrebljavati za ispitivanja u različitim vremenima ili za vrednovanje dopunskih krajnjih točaka. Mladunci koji nisu raspoređeni u kohorte podvrgavaju se kliničkoj biokemiji (stavak 55.) i makroskopskoj nekropsiji (stavak 68.)

Drugo parenje životinja P

35. Drugo parenje u pravilu se ne preporučuje za životinje P jer zbog njega dolazi do gubitka važnih informacija o broju mjesta za implantaciju embrija (a time i podataka o razdoblju nakon implantacije i perinatalnom gubitku, pokazatelja mogućeg teratogenog potencijala) za prvo leglo. Potreba za provjerom ili pojašnjenjem učinka kod izloženih ženki bolje bi se zadovoljila produljenjem studije i proširivanjem na parenje generacije F_1. Međutim, drugo parenje mužjaka P s netretiranim ženkama uvijek je mogućnost za pojašnjavanje dvosmislenih nalaza ili za daljnju karakterizaciju učinaka na plodnost uočenih kod prvog parenja.

OPAŽANJA UŽIVO

Klinička opažanja

36. Pri životinjama P i odabranim životinjama F_1, opća klinička opažanja obavljaju se jednom dnevno. U slučaju doziranja sondom, klinička opažanja treba obavljati prije ili nakon doziranja (radi mogućih znakova toksičnosti povezanih s vršnom koncentracijom plazme). Treba bilježiti relevantne promjene ponašanja, znakove otežane ili produžene parturicije i sve znakove toksičnosti. Dvaput dnevno, a tijekom vikenda jednom dnevno, obavlja se opažanje svih životinja s obzirom na tešku toksičnost, morbiditet i mortalitet.

37. Osim toga, jednom tjedno obavlja se detaljniji pregled svih životinja P i F_1 (nakon odbijanja od sise) koji se može obaviti pri vaganju životinje, čime se umanjuje stres pri rukovanju. Opažanja treba pažljivo obaviti i bilježiti s pomoću sustava vrednovanja koje je utvrdio ispitni laboratorij. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima ispitivanja budu minimalna. Znakovi koji se bilježe trebaju uključivati, ali ne biti ograničeni na, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, na pojavu iscjedaka, na izlučine i autonomne aktivnosti (lakrimacija (lučenje suza), piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u kretanju, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničnih ili toničnih kretnji, stereotipa (npr. prekomjerno njegovanje dlake, stalno kretanje u krug) ili bizarno ponašanje (npr. samoranjavanje, hodanje unatrag).

▼M5

Tjelesna masa i unos hrane/vode

38. Životinje P važu se prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno. Osim toga, ženke P važu se tijekom laktacije istih dana kao i mladunci u njihovim leglima (vidjeti stavak 44.) Sve životinje F_1 važu se pojedinačno kod odbijanja od sise (21. PND), a zatim najmanje jednom tjedno. Tjelesna masa bilježi se i na dan ulaska u pubertet (dovršetak razdvajanja prepucija ili vaginalna prohodnost). Sve životinje važu se u trenutku usmrćivanja.

39. Tijekom studije unos hrane i vode (u slučaju primjene ispitivane kemikalije u vodi za piće) bilježi se najmanje jednom tjedno istih dana kao i tjelesne mase životinja (osim tijekom kohabitacije). Unos hrane svakog kaveza sa životinjama F_1 bilježi se jednom tjedno počevši od odabira odgovarajuće kohorte.

Ciklusi estrusa

40. Privremene informacije o učincima ispitivane kemikalije na ciklus estrusa već se mogu pronaći u ranijim studijama toksičnosti s ponovljenim dozama te se mogu upotrebljavati kod dizajniranja protokola specifičnog za ispitivanu kemikaliju za produljenu studiju reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji. U pravilu će procjena ciklusa estrusa (s pomoću vaginalne citologije) započeti na početku razdoblja tretiranja te se nastaviti do parenja ili kraja dvotjednog razdoblja parenja. Ako je probir ženki za normalni ciklus estrusa obavljen prije tretmana, tada je korisno nastaviti s uzimanjem briseva s početkom tretmana, ali ako postoji dvojba o nespecifičnim učincima na početku tretmana (poput početnog zabilježenog smanjenja unosa hrane), moguće je životinjama dopustiti adaptaciju na tretman do najdulje dva tjedna prije početka dvotjednog razdoblja uzimanja briseva nakon kojeg slijedi uparivanje. Ako se na taj način produljuje razdoblje tretiranja ženki (tj. na četverotjedni tretman prije parenja), tada treba razmotriti nabavu mlađih životinja te produljenje razdoblja tretmana mužjaka prije uparivanja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza i, kasnije, ne izazove lažna trudnoća (10) (11).

41. Vaginalne briseve svih ženki F_1 iz 1.A kohorte treba svakodnevno pregledavati nakon početka vaginalne prohodnosti dok se ne zabilježi prvi kornificirani bris kako bi se utvrdio vremenski interval između ta dva događaja. Treba pratiti i cikluse estrusa svih ženki F_1 iz 1.A kohorte u razdoblju od dva tjedna, počevši oko 75. postnatalnog dana. Osim toga, ako je potrebno parenje generacije F_1, vaginalna citologija u 1.B kohorti slijedit će se od trenutka uparivanja do parenja.

Parenje i graviditet

42. Osim standardnih krajnjih točaka (npr. tjelesna masa, unos hrane, klinička opažanja uključujući provjere mortaliteta/morbiditeta), bilježe se datumi uparivanja, datum inseminacije i datum parturicije te se računaju prekoitalni interval (od uparivanja do inseminacije) i trajanje graviditeta. Ženke P treba pomnjivo pregledati u vrijeme očekivane parturicije radi znakova distocije. Treba zabilježiti sve znakove abnormalnosti pri izradi gnijezda ili dojenja.

▼M5

43. Dan kad dođe do parturicije nulti je dan laktacije za ženku i nulti postnatalni dan za potomstvo. Alternativno, sve se usporedbe mogu temeljiti i na postkoitalnom vremenu kako bi se izbjeglo miješanje podataka o postnatalnom razvoju zbog razlika u trajanju graviditeta. Međutim, treba zabilježiti i vrijeme u odnosu na parturiciju. To je osobito važno ako ispitivana kemikalija utječe na trajanje graviditeta.

Parametri potomaka

44. Svako leglo treba pregledati čim prije nakon parturicije (nulti ili 1. postnatalni dan) i utvrditi broj i spol mladunaca, broj mrtvorođenih, broj živorođenih te prisutnost velikih anomalija (vidljive abnormalnosti, uključujući rascjep nepca, potkožna krvarenja, abnormalnu boju ili strukturu kože, pojavu pupčane vrpce, manjak mlijeka u želucu, pojavu suhih sekreta). Osim toga, prvi klinički pregled nakon okota treba uključivati kvalitativnu procjenu tjelesne temperature, stanja aktivnosti i reakcije na rukovanje. Mladunce koji su nultog postnatalnog dana ili kasnije nađeni mrtvi treba pregledati s obzirom na moguće defekte i uzrok smrti. Živi mladunci prebrojavaju se i pojedinačno važu nultog ili 1. postnatalnog dana i redovno nakon toga, npr. barem 4., 7., 14. i 21. postnatalnog dana. Kliničke preglede prema starosti životinja treba ponavljati pri vaganju potomaka ili češće ako su prilikom okota utvrđeni specifični nalazi. Zabilježeni znakovi mogu uključivati, ali ne moraju biti ograničeni na vanjske abnormalnosti, promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka i izlučina i autonomnu aktivnost. Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na rukovanje, kao i prisutnost kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipa ili bilo kakvog neobičnog ponašanja.

45. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca barem jednom od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba ujednačiti prema veličini mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase (12)). 12. ili 13. postnatalnog dana treba provjeriti postojanje bradavica/areola u mužjaka mladunaca.

46. Sve odabrane životinje F_1 svakodnevno se pregledavaju radi razdvajanja prepucija na glavici penisa u mužjaka, odnosno vaginalne prohodnosti u ženki prije očekivanog dana pojave tih krajnjih točaka radi utvrđivanja rane pojave spolnog sazrijevanja. Treba zabilježiti sve abnormalnosti genitalnih organa, poput postojane vaginalne niti, hipospadije ili rascjepa penisa. Spolno sazrijevanje životinja F_1 uspoređuje se s fizičkim razvojem utvrđivanjem starosti i tjelesne mase kod razdvajanja prepucija na glavici penisa u mužjaka, odnosno vaginalne prohodnosti u ženki (13).

Procjena potencijalne razvojne neurotoksičnosti (2.A i 2.B kohorta)

47. Za procjene neurotoksičnosti treba upotrebljavati 10 mužjaka i 10 ženki iz 2.A kohorte i 10 mužjaka i 10 ženki iz 2.B kohorte iz svake skupine za tretiranje (za svaku kohortu: 1 mužjak ili 1 ženka po leglu; najmanje 1 mladunac iz svakog legla; nasumično odabrani). Životinje iz 2.A kohorte treba podvrgnuti iznenadnoj buci, funkcionalno-opservacijskoj bateriji, motoričkoj aktivnosti (vidjeti stavke 48. do 50.) i neuropatološkim procjenama (vidjeti stavke 74. do 75.). Treba nastojati osigurati da varijacije ispitnih uvjeta budu minimalne te da nisu sustavno povezane s tretiranjem.

▼M5

Neke varijable koje mogu utjecati na ponašanje jesu razina buke (npr. povremena buka), temperatura, vlažnost, rasvjeta, mirisi, doba dana te distrakcije iz okoline. Rezultate testova neurotoksičnosti treba tumačiti u odnosu na odgovarajuće povijesne kontrolne referentne raspone. Kohortu 2.B treba upotrebljavati za neuropatološku procjenu 21. ili 22. postnatalnog dana (vidjeti stavke 74. do 75.).

48. Ispitivanje reakcije na iznenadnu buku treba provesti 24. postnatalnog dana (± 1 dan) na životinjama iz 2.A kohorte. Dan ispitivanja treba ujednačiti s obzirom na skupine za tretiranje i kontrolne skupine. Svaka se sesija sastoji od 50 pokušaja. Kod provođenja ispitivanja reakcije na iznenadnu buku treba odrediti srednju amplitudu reakcije svakog skupa od 10 pokušaja (5 skupova od 10 pokušaja) uz uvjete ispitivanja koji su optimizirani tako da izazovu habituaciju tijekom sesije. Ti bi postupci trebali biti u skladu s ispitnom metodom B.53 (35).

49. U odgovarajućem trenutku između 63. i 75. postnatalnog dana životinje se podvrgavaju funkcionalno-opservacijskoj bateriji i automatskom ispitivanju motoričke aktivnosti. Ti bi postupci trebali biti u skladu s ispitnim metodama B.43 (33) i B.53. (35). Funkcionalno-opservacijska baterija uključuje detaljan opis izgleda, ponašanja i funkcionalnog integriteta pokusne životinje. To se procjenjuje opažanjem u kavezu u kojem životinje inače borave, nakon smještaja u standardni prostor radi opažanja (otvoreni prostor) gdje se životinja slobodno kreće i manipulativnim ispitivanjima. Ispitivanje treba provoditi od najmanje interaktivnog prema najviše interaktivnom. Popis mjera navodi se u Dodatku 1. Opažanja svih životinja trebale bi obavljati osposobljene osobe koje nemaju saznanja o statusu tretmana životinja s pomoću standardiziranih postupaka kako bi se njihova varijabilnost svela na najmanju moguću mjeru. Savjetuje se da po mogućnosti ista osoba koja obavlja opažanja vrednuje životinje u određenom ispitivanju. Ako to nije moguće, potreban je neki dokaz o pouzdanosti osoba koje obavljaju opažanje. Za svaki parametar u bihevioralnoj ispitnoj bateriji treba upotrebljavati eksplicitne, operativno definirane raspone i kriterije vrednovanja. Po mogućnosti treba razviti objektivne kvantitativne mjere za opservacijske krajnje točke koje uključuju subjektivno rangiranje. Kod motoričke aktivnosti svaka se životinja pojedinačno ispituje. Ispitivanje bi trebalo trajati dovoljno dugo da se dokaže habituacija između sesija kod kontrolnih skupina. Motoričku aktivnost treba pratiti aparatom za bilježenje automatske aktivnosti kojime bi trebalo biti moguće utvrditi povećanja i smanjenja aktivnosti (odnosno, osnovna aktivnosti koju uređaj mjeri ne bi trebala biti ni toliko niska da bi se spriječilo utvrđivanje smanjenja ni toliko visoka da bi se spriječilo utvrđivanje povećanja aktivnosti). Svaki uređaj treba ispitati standardnim postupcima kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri osigurala pouzdanost rada s obzirom na sve uređaje i dane. Skupine za tretiranje u najvećoj bi se mogućoj mjeri trebale ujednačiti s obzirom na sve uređaje. Skupine za tretiranje trebale bi biti uravnotežene s obzirom na vremena ispitivanja kako bi se izbjeglo zbunjivanje zbog cirkadijurnih ritmova aktivnosti.

50. Ako se postojećim informacijama ukazuje na potrebu za ostalim funkcionalnim ispitivanjima (npr. senzorno, socijalno, kognitivno), njih treba uključiti bez narušavanja cjelovitosti ostalih evaluacija koje se provode studijom. Ako se ispitivanje provodi na istim životinjama kao i ispitivanje reakcije na iznenadnu buku, funkcionalno-opservacijsku bateriju i ispitivanje motoričke aktivnosti treba planirati tako da se rizik od narušavanja cjelovitosti tih ispitivanja svede na najmanju moguću mjeru. Dopunski postupci mogu biti osobito korisni kada empirijsko opažanje, očekivani učinci ili mehanizam/način funkcioniranja ukazuju na posebnu vrstu neurotoksičnosti.

▼M5

Procjena potencijalne razvojne imunotoksičnosti (3. kohorta)

51. Na 56. postnatalni dan (± 3 dana) 10 mužjaka i 10 ženki iz 3. kohorte iz svake skupine za tretiranje (1 mužjak ili 1 ženka po leglu; najmanje 1 mladunac iz svakog legla; nasumično odabrani) treba upotrijebiti u testu reakcije antitijela ovisnih o T-stanicama, odnosno prvotnoj reakciji antitijela IgM na antigen ovisan o T-stanicama, poput crvenih krvnih stanica ovce (SRBC) ili hemocijanina iz puža priljepka (KLH), u skladu s postojećim postupcima ispitivanja imunotoksičnosti (14) (15). Reakciju je moguće procijeniti prebrojavanjem specifičnih stanica koje tvore plak (PFC) i slezeni ili utvrđivanjem titra IgM antitijela specifičnog za SRBC ili KLH u serumu ELISA testom na vrhuncu reakcije. Reakcije su u pravilu na vrhuncu četiri (reakcija PFC) ili pet (ELISA) dana nakon intravenozne imunizacije. Ako se prvotna reakcija antitijela procjenjuje prebrojavanjem stanica koje tvore plak, dopuštena je procjena podskupina životinja u zasebne dane uz uvjet da se imunizacija i usmrćivanje podskupine planiraju tako da se stanice koje tvore plak broje na vrhuncu reakcije, da podskupine sadržavaju jednaki broj muških i ženskih potomaka iz svih skupina za doziranje, uključujući kontrolne, te da se podskupine procjenjuju u približno jednakoj postnatalnoj dobi. Izlaganje ispitivanoj kemikaliji nastavit će se do dana prikupljanja slezena za reakciju stanica koje tvore plak ili seruma za test ELISA.

Nastavak procjene potencijalne reproduktivne toksičnosti (1.B kohorta)

52. Životinje iz 1.B kohorte prema potrebi se mogu zadržati u tretmanu nakon 90. postnatalnog dana te uzgajati kako bi se dobila generacija F_2. Mužjake i ženke iz iste skupine za doziranje treba smjestiti zajedno (uz izbjegavanje uparivanja braće i sestara) do najdulje dva tjedna, počevši od 90. postnatalnog dana ili nakon njega, ali ne dulje od 120. postnatalnog dana. Postupci bi trebali biti slični onima u životinja P. Međutim, na temelju dokaza, usmrćivanje legala 4. postnatalnog dana može biti dovoljno, umjesto praćenja do odbijanja od sise ili nakon njega.

ZAVRŠNA OPAŽANJA

Klinička biokemija/hematologija

53. U životinja P treba pratiti sustavne učinke. Po usmrćenju s utvrđenog se mjesta uzimaju uzorci krvi deset nasumično odabranih mužjaka i ženki P po skupini za doziranje koji su postili, pohranjuju u odgovarajućim uvjetima i podvrgavaju djelomičnoj ili potpunoj hematologiji, kliničkoj biokemiji, testu T4 ili TSH ili drugim pregledima u skladu s poznatim profilom učinka ispitivane kemikalije (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 151 (40)). Treba ispitati sljedeće hematološke parametre: hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupan i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i vrijeme/potencijal zgrušavanja krvi. Pretrage plazme ili seruma trebale bi uključivati: određivanje razine glukoze, ukupnog kolesterola, ureje, kreatinina, ukupnih proteina, albumina i najmanje dva enzima koji su pokazatelji hepatocelularnih učinaka (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama glutamil transpeptidaza i sorbitol dehidrogenaza). Mjerenja dodatnih enzima i žučnih kiselina mogu u određenim uvjetima pružiti korisne informacije. Osim toga, svim se životinjama krv može izvaditi i pohraniti za moguću kasniju analizu radi pojašnjavanja dvosmislenih učinaka ili dobivanja podataka o internom izlaganju. Ako se ne planira drugo parenje

▼M5

životinja P, uzorci krvi uzimaju se neposredno prije ili u okviru postupka kod planiranog usmrćivanja. U slučaju zadržavanja životinja uzorke krvi treba prikupiti nekoliko dana prije drugog parenja životinja. Osim ako se postojećim podacima iz studija s ponovljenim dozama ukazuje na to da ispitivana kemikalija ne utječe na parametar, prije usmrćenja treba provesti analizu urina i treba procijeniti sljedeće parametre: izgled, volumen, osmolalnost ili specifičnu težinu, pH, protein, glukozu, krv i krvne stanice, ostatke stanica. Urin se može prikupljati i radi praćenja izlučivanja ispitivane kemikalije i/ili metabolita.

54. U životinja F_1 treba pratiti i sustavne učinke. Po usmrćenju s utvrđenog se mjesta uzimaju uzorci krvi deset nasumično odabranih mužjaka i ženki iz 1.A kohorte po skupini za doziranje koji su postili, pohranjuju u odgovarajućim uvjetima i podvrgavaju standardnoj kliničkoj biokemiji, uključujući procjenu razina seruma hormona štitnjače (T4 i TSH), hematologiji (ukupni i diferencijalni broj leukocita i broj eritrocita) i procjenama analize urina.

55. Prekobrojni se mladunci 4. postnatalnog dana podvrgavaju makroskopskoj nekropsiji te se razmatra mjerenje koncentracija seruma hormona štitnjače (T4). Krv tek okoćenih životinja (4. PND) može se izvaditi po leglima radi biokemijskih analiza ili analiza hormona štitnjače. Za analizu T4 i TSH krv se vadi i životinjama koje su upravo odbijene od sise koje se podvrgavaju makroskopskoj nekropsiji 22. postnatalnog dana (mladunci F_1 ne raspoređuju se u kohorte).

Parametri sperme

56. Parametre sperme treba mjeriti u svih mužjaka generacije P, osim ako postoje podaci kojima se dokazuje da nema utjecaja na parametre sperme u studiji koja traje 90 dana. Ispitivanje parametara sperme treba provesti u svih mužjaka iz 1.A kohorte.

57. Po usmrćenju bilježe se mase testisa i epididimisa svih mužjaka P i F_1 (1.A kohorta). Barem jedan testis i jedan epididimis čuvaju se radi histopatološkog pregleda. Preostali epididimisi upotrebljavaju se za prebrojavanje zaliha sperme iz repa epididimisa (16)(17). Osim toga, zaliha sperme iz repa epididimisa (ili sjemenovoda) prikuplja se s pomoću metoda kojima se oštećenje za procjenu pokretljivosti i morfologije spreme svodi na najmanju moguću mjeru (18).

58. Pokretljivost sperme može se procijeniti neposredno nakon usmrćivanja ili zabilježiti za daljnju analizu. Postotak progresivno pokretljive sperme može se utvrditi subjektivno ili objektivno s pomoću računalne analize pokreta (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kod procjene morfologije sperme uzorak sperme iz epididimisa (ili sjemenovoda) treba ispitati kao fiksirane ili mokre pripravke (25) te najmanje 200 spermatozoida po uzorku klasificirati kao normalne (glava i tijelo/rep normalnog su izgleda) ili abnormalne. Primjeri morfoloških anomalija spermatozoida obuhvaćaju fuziju, odvojene glave i deformirane glave i/ili repove (26). Deformirane ili velike glave spermatozoida mogu ukazivati na defekte kod spermijacije.

59. Ako se pri nekropsiji zamrzavaju uzorci sperme, fiksiraju brisevi i bilježe slike analize mobilnosti sperme (27), naknadna analiza može se ograničiti na kontrolne mužjake i mužjake kojima se daje visoka doza. Međutim, ako se uoče učinci povezani s tretmanom, treba procijeniti i skupine kojima se daje niža doza.

▼M5

Makroskopska nekropsija

60. U vrijeme usmrćenja ili u slučaju preuranjene smrti sve životinje P i F_1 podvrgavaju se nekropsiji i makroskopskom pregledu radi otkrivanja svih strukturnih abnormalnosti ili patoloških promjena. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Mladunce koji su humano usmrćeni, na samrti ili mrtvi treba zabilježiti i, ako nisu macerirani, pregledati s obzirom na moguće patološke promjene i/ili uzrok smrti, i konzervirati.

61. U odraslih ženki P i F^1 vaginalni bris pregledava se na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom reproduktivnih organa. Maternice svih životinja P (po potrebi i ženku F_1) pregledavaju se s obzirom na postojanje i broj mjesta za implantaciju embrija bez narušavanja histopatološke procjene.

Masa organa i čuvanje tkiva – odrasle životinje P i F_1

62. Po usmrćenju utvrđuju se tjelesne mase i mokre mase organa navedenih u nastavku svih životinja P i svih odraslih životinja F_1 iz relevantnih kohorti (kako se navodi u nastavku) u najkraćem mogućem roku kako bi se izbjeglo sušenje. Te organe potom treba čuvati u odgovarajućim uvjetima. Osim ako je drukčije navedeno, upareni organi mogu se vagati pojedinačno ili zajedno u skladu s tipičnom praksom laboratorija koji provodi ispitivanje.

— maternica (s jajovodima i cerviksom), jajnici,

— testisi, epididimisi (cijeli i repovi za uzorke za prebrojavanje sperme),

— prostata (kombinacija dorsolateralnih i ventralnih dijelova). Pri odvajanju prostate treba paziti kako bi se izbjegla punkcija sjemenih vezikula ispunjenih tekućinom. U slučaju učinka povezanog s tretmanom na ukupnu masu prostate dorsolateralne i ventralne segmente treba pažljivo odvojiti nakon fiksiranja i zasebno izvagati,

— sjemene vezikule s prednjim režnjem prostate i njihovim fluidima (kao jedna cjelina),

— mozak, jetra, bubrezi, srce, slezena, timus, hipofiza, tiroidna žlijezda (nakon fiksiranja), nadbubrežna žlijezda i poznati ciljni organi ili tkiva.

63. Osim gore navedenih organa, u odgovarajućim uvjetima treba čuvati uzorke perifernih živaca, mišića, leđne moždine, oka i optičkog živca, probavnog trakta, mokraćnog mjehura, pluća, dušnika (s tiroidnom i paratiroidnom žlijezdom), koštane srži, sjemenovoda (u mužjaka), mliječnih žlijezda (u mužjaka i ženki) i vagine.

64. Svi organi životinja iz 1.A kohorte važu se i čuvaju za histopatologiju.

65. Radi ispitivanja prenatalnih i postnatalnih imunotoksičnih učinaka 10 mužjaka i 10 ženki iz 1.A kohorte iz svake skupine za tretiranje (1 mužjak ili 1 ženka po leglu; najmanje 1 mladunac iz svakog legla; nasumično odabrani) po usmrćenju podvrgnut će se sljedećem:

— vaganju limfnih čvorova povezanih s putem izlaganja i udaljenima od njega (uz vaganje nadbubrežne žlijezde, timusa i slezene koje je već provedeno u svih životinja iz 1.A kohorte),

▼M5

— analizi subpolulacije limfocita u slezeni (T-limfociti CD4+ i CD8+, B-limfociti i prirodno ubojite stanice) na jednoj polovici slezene, dok će se druga čuvati za histopatološku procjenu.

Analizom subpopulacija limfocita u slezeni u necijepljenih životinja (1.A kohorta) utvrdit će se je li izlaganje povezano s pomakom u imunološkoj stabilnoj distribuciji „pomagača" (CD4+) ili citoksičnih limfocita koje proizvodi timus (CD8+) ili prirodno ubojite (NK) stanica (brze reakcije na neoplastične stanice i patogene).

66. Sljedeće organe životinja iz 1.B kohorte treba izvagati, a odgovarajuća tkiva obraditi do faze blokiranja:

— vagina (neizvagana),

— maternica s cerviksom,

— jajnici,

— testisi (barem jedan),

— epididimis,

— sjemene vezukule s prednjim režnjem prostate,

— prostata,

— hipofiza,

— identificirani ciljni organi.

Histopatologija na 1.B kohorti obavila bi se u slučaju dvosmislenosti rezultata 1.A kohorte ili u slučajevima sumnje na reproduktivne ili endokrine toksične tvari.

67. Kohorte 2.A i 2.B: ispitivanje razvojne neurotoksičnosti (21. ili 22. PND i odrasli potomci). Životinje iz 2.A kohorte usmrćuju se nakon bihevioralnog ispitivanja, bilježi se težina njihovih mozgova te se radi procjene neurotoksičnosti obavlja potpuna neurohistopatologija. Životinje iz 2.B kohorte usmrćuju se 21. ili 22. postnatalnog dana, bilježi se težina njihovih mozgova te se radi procjene neurotoksičnosti obavlja mikroskopski pregled mozga. Perfuzijska fiksacija obvezna je u životinja iz 2.A kohorte, dok u životinja iz 2.B kohorte nije kako je predviđeno ispitnom metodom B.53 (35).

Masa organa i čuvanje tkiva – životinje F_1 koje se upravo odbijaju od sise

68. Mladunci koji nisu raspoređeni u kohorte, uključujući patuljaste životinje, usmrćuju se nakon odbijanja od sise 22. postnatalnog dana, osim ako se rezultatima ne ukazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjima uživo. Usmrćeni mladunci podvrgavaju se makroskopskoj nekropsiji, uključujući procjenu reproduktivnih organa kako je opisano u stavcima 62. i 63. Mozak, slezenu i timus najviše deset mladunaca po spolu i skupini iz što je više moguće legala treba izvagati i čuvati u odgovarajućim uvjetima. Osim toga, mliječne žlijezde tih mužjaka i ženki mladunaca mogu se čuvati za daljnju mikroskopsku analizu ([1]) (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 151 (40)). Makroabnormalnosti i ciljna tkiva treba sačuvati radi mogućeg histološkog pregleda.

([1]) Istraživanja su pokazala da su mliječne žlijezde osjetljiva krajnja točka za estrogensko djelovanje, osobito u njihovoj ranoj dobi. Preporučuje se uključivanje krajnjih točaka kojima su obuhvaćene mliječne žlijezde obaju spolova u ovu ispitnu metodu nakon validacije.

▼M5

Histopatologija – životinje P

69. Potpuna histopatologija organa navedenih u stavcima 62. i 63. obavlja se na svim životinjama P iz kontrolne skupine i skupine koja je primala visoku dozu. Treba pregledati i organe svih životinja iz skupina koje su primale nižu dozu u kojih su uočene promjene povezane s tretmanom radi utvrđivanja vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci. Osim toga, reproduktivne organe svih životinja u kojih se sumnja na smanjenu plodnost, npr. u životinja koje se nisu parile, nisu začele, proizvele i okotile zdravo potomstvo, ili u kojih je bilo utjecaja na ciklus estrusa ili broj, pokretljivost ili morfologiju spermatozoida, kao i sve makrolezije treba histopatološki obraditi.

Histopatologija – životinje F_1

Životinje iz 1. kohorte

70. Potpuna histopatologija organa navedenih u stavcima 62. i 63. obavlja se na svim odraslim životinjama iz 1.A kohorte iz kontrolne skupine i skupine koja je primala visoku dozu. Najmanje jedan mladunac po spolu trebao bi predstavljati svako leglo. Treba pregledati i organe i tkiva svih životinja iz skupina koje su primale nižu dozu u kojih su uočene promjene povezane s tretmanom i sve makrolezije radi utvrđivanja vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci. Radi procjene prenatalnih i postnatalnih učinaka na limfne organe treba procijeniti i histopatologiju na prikupljenim limfnim čvorovima i koštanoj srži 10 mužjaka i 10 ženki iz 1.A kohorte uz već provedenu histopatološku procjenu timusa, slezene i nadbubrežnih žlijezda u svih životinja iz 1.A kohorte.

71. Reproduktivna i endokrina tkiva svih životinja iz 1.B kohorte obrađenih do faze blokiranja prema opisu iz stavka 66. treba pregledati radi histopatologije u slučajevima sumnje na reproduktivne ili endokrine toksične tvari. I 1.B kohortu treba podvrgnuti histološkom pregledu ako su rezultati 1.A kohorte dvosmisleni.

72. Jajnici odraslih ženki trebali bi sadržavati primordijalne i folikule u rastu, kao i žuta tijela. Zato histopatološki pregled treba usmjeriti na otkrivanje kvantitativne procjene primordijalnih folikula i malih folikula u rastu, kao i žutih tijela u ženki F_1. Broj životinja, odabir sekcije jajnika i veličina uzorka sekcije trebali bi statistički odgovarati upotrijebljenom postupku procjene. Prebrojavanje folikula moguće je prvo obaviti na kontrolnim životinjama i životinjama koje su primale visoku dozu, a u slučaju nepovoljnog učinka u potonjih treba razmotriti niže doze. Radi usporedbe tretiranih i kontrolnih jajnika pregled bi trebao obuhvatiti brojanje primordijalnih folikula, kombinirano s malim folikulima u rastu (vidjeti OECD-ovu Smjernicu 151 (40)). Procjenu žutih tijela treba provesti usporedno s ispitivanjem ciklusa estrusa tako da se kod procjene može uzeti u obzir faza ciklusa. Jajovodi, maternica i vagina pregledavaju se radi odgovarajućeg razvoja tipičnog za organe.

73. Obavljaju se detaljni histopatološki pregledi testisa na mužjacima F_1 kako bi se utvrdili učinci povezani s tretmanom na diferencijaciju i razvoj testisa i na spermatogenezu (38). Po mogućnosti treba pregledati i sekcije rete testisa. Pregledavaju se glava, tijelo i rep epididimisa i sjemenovodi s obzirom na odgovarajući razvoj tipičan za organe, kao i na parametre potrebne za mužjake P.

▼M5

Životinje iz 2. kohorte

74. Neurohistopatologija se obavlja u svih životinja koje su primale visoku dozu i kontrolnih životinja iz 2.A kohorte po spolu nakon dovršetka neurobihevioralnog ispitivanja (nakon 75. postnatalnog dana, ali ne dulje od 90. postnatalnog dana). Histopatologija mozga obavlja se u svih životinja koje su primale visoku dozu i kontrolnih životinja iz 2.B kohorte po spolu 21. ili 22. postnatalnog dana. Treba pregledati i organe i tkiva svih životinja iz skupina koje su primale nižu dozu u kojih su uočene promjene povezane s tretmanom radi utvrđivanja vrijednosti kod kojih nisu uočeni štetni učinci. Kod životinja iz 2.A i 2.B kohorte pregledava se više sekcija mozga kako bi se omogućio pregled olfaktornog bulbusa, cerebralnog korteksa, hipokampusa, bazalnih ganglija, talamusa, hipotalamusa, srednjeg mozga (krova, tegmentuma i moždanih krakova), moždanog debla i malog mozga. Samo kod 2.A kohorte pregledavaju se i oči (mrežnica i vidni živac) te uzorci perifernih živaca. Svi neurohistološki postupci trebali bi biti u skladu s ispitnom metodom B.53 (35).

75. Morfometričke (količinske) procjene treba obaviti na reprezentativnim regijama mozga (homologne sekcije pažljivo odabrane na temelju pouzdanih mikroskopskih posebnosti), a one mogu uključivati linearna i/ili prostorna mjerenja specifičnih regija mozga. Najmanje tri uzastopne sekcije treba uzeti kod svake posebnosti (razine) radi odabira najviše homogene i reprezentativne sekcije za specifičnu regiju mozga koju treba procijeniti. Neuropatolog bi trebao procijeniti jesu li sekcije pripremljene za mjerenje homologne u odnosu na ostale u uzorku, a time i prikladne za uključivanje s obzirom na to da se osobito linearne mjere mogu promijeniti na relativno kratkoj udaljenosti (28). Nehomologne sekcije ne treba upotrebljavati. Iako je cilj uzorkovati sve životinje predviđene u tu svrhu (10/spol/visina doze), i manje vrijednosti mogu biti odgovarajuće. Međutim, uzorci od manje od šest životinja po spolu i visini doze u pravilu se ne bi smatrali dovoljnima za potrebe ove ispitne metode. Stereologija se može upotrebljavati za identifikaciju učinaka povezanih s tretmanom na parametre poput volumena ili broja stanica za posebne neuroanatomske dijelove. Sve aspekte pripreme uzoraka tkiva, od fiksiranja tkiva, preko disekcije uzoraka tkiva, obrada tkiva te bojenje preparata treba obaviti prema uravnoteženom planu tako da svaka serija uključuje reprezentativne uzorke svake skupine koja je primila određenu dozu. Ako treba koristiti morfometričke ili stereološke analize, tada moždano tkivo treba uklopiti u dogovarajući medij istodobno na svim visinama doze kako bi se izbjeglo skupljanje artefakata povezanih s produljenim čuvanjem u fiksativu.

IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

76. Podaci se navode pojedinačno i sažeto u obliku tablice. Prema potrebi za svaku ispitnu skupinu i svaku generaciju treba navesti sljedeće podatke: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su pronađene mrtve tijekom ispitivanja ili koje su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme svake smrti ili humanog usmrćivanja, broj plodnih životinja, broj skotnih ženki, broj životinja koje su okotile leglo te broj životinja u kojih su uočeni znakovi toksičnosti. Treba navesti i opis toksičnosti, uključujući vrijeme početka, trajanje i težinu.

77. Numeričke rezultate treba procijeniti primjerenom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode treba birati kod dizajna studije, a njima na primjeren način treba obuhvatiti nenormalne podatke (npr. podatke o broju), cenzurirane podatke (npr. ograničeno vrijeme opažanja), neovisnost (npr. učinci na leglo i ponovljene mjere) te nejednake varijance.

▼M5

Općenitim linearnim miješanim modelima i modelima doza-reakcija obuhvaćena je široka klasa analitičkih alata koji mogu biti odgovarajući za podatke dobivene ovom ispitnom metodom. Izvješće bi trebalo sadržavati dovoljno informacija o analitičkoj metodi i računalnom programu koji je upotrijebljen kako bi neovisni revizor/statističar mogao procijeniti/ponovno procijeniti analizu.

Vrednovanje rezultata

78. Nalaze treba vrednovati s obzirom na uočene učinke, uključujući nekropsiju i mikroskopske nalaze. Vrednovanje uključuje odnos, ili njegov izostanak, između doze i postojanja, pojave i težine abnormalnosti, uključujući makrolezije. Treba vrednovati i ciljne organe, kliničke abnormalnosti, reproduktivno funkcioniranje i funkcioniranje legla, promjene tjelesne mase, mortalitet i sve ostale toksične i razvojne učinke. Posebnu pažnju treba posvetiti promjenama specifičnima za spol. Kod vrednovanja rezultata ispitivanja treba uzeti u obzir fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije i, ako su dostupni, toksikokinetičke podatke, uključujući prijenos u posteljici i izlučivanje mlijeka.

Izvješće o ispitivanju

79. Izvješće o ispitivanju trebalo bi uključivati sljedeće informacije dobivene u postojećoj studiji na životinjama P, F_1 i F_2 (prema potrebi):

Ispitivana kemikalija

— sve relevantne dostupne informacije o kemikaliji, toksikokinetičkim i toksikodinamičkim obilježjima ispitivane kemikalije,

— identifikacijski podaci,

— čistoća.

Nosač (prema potrebi)

— obrazloženje za odabir nosača, ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje

— upotrijebljena vrsta/soj,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana, materijal za izradu gnijezda itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,

— podaci o vaginalnom brisu ženki P prije početka tretmana (ako se podaci tada prikupljaju),

— evidencije uparivanja generacije P uz navođenje muškog i ženskog partnera kod parenja te uspjeh parenja,

— evidencije o leglu podrijetla za odrasle životinje generacije F_1.

Ispitni uvjeti

— podloge za odabir visine doze,

— pojedinosti o sastavu ispitivane kemikalije/pripremi hrane, postignutim koncentracijama,

▼M5

— stabilnost i homogenost pripravka u nosaču ili drugom nosaču (npr. prehrana, voda za piće), u krvi i/ili mlijeku u uvjetima upotrebe i pohranjivanja između upotreba,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— preračunavanje koncentracije (ppm) ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće u postignutu dozu (mg/kg tjelesne mase/dan), ako je primjenljivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode (uključujući, po mogućnosti, sastav hrane),

— detaljan opis postupaka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje te za raspodjelu mladunaca u ispitne skupine,

— okolišni uvjeti,

— popis osoblja koje je sudjelovalo u studiji, uključujući stručno usavršavanje.

Rezultati (sažetak i pojedinačni podaci po spolu i dozi)

— unos hrane, unos vode ako je dostupan, učinkovitost hrane (porast tjelesne mase po gramu unesene hrane, osim za razdoblje kohabitacije i tijekom laktacije) i unos ispitivane kemikalije (za primjenu hranom/vodom) za životinje P i F_1,

— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),

— podaci o tjelesnoj masi životinja P,

— podaci o tjelesnoj masi odabranih životinja F_1 nakon odbijanja od sise,

— vrijeme smrti tijekom studije ili preživljavanje životinja do usmrćenja,

— karakter, težina i trajanje kliničkih opažanja (jesu li reverzibilna ili ne),

— hematologija, analiza urina i podaci o kliničkoj kemiji uključujući TSH i T4,

— fenotipska analiza stanica slezene (T-, B-, NK-stanice),

— celularnost koštane srži,

— podaci o toksičnoj reakciji,

— broj ženki P i F_1 s normalnim i abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,

— vrijeme do parenja (interval prije koitusa, broj dana između uparivanja i parenja),

— toksični ili drugi učinci na reprodukciju, uključujući brojeve i postotke životinja koje su postigle parenje, graviditet, parturiciju i laktaciju, mužjaka koji su uzrokovali graviditet, ženki sa znakovima distocije/produljene ili otežane parturicije,

— trajanje graviditeta i parturicije, ako je dostupno,

— broj implantacija, veličina legla i postotak muških mladunaca,

— broj i postotak gubitaka nakon implantacije, živorođenih i mrtvorođenih,

▼M5

— masa legla i podaci o masi mladunaca (mužjaka, ženki i kombinirano), broj patuljastih životinja ako je utvrđen,

— broj mladunaca s makroabnormalnostima,

— toksični i drugi učinci na potomstvo, postnatalni rast, vitalnost itd.,

— podaci o fizičkim posebnostima mladunaca i ostali podaci o postnatalnom razvoju,

— podaci o spolnom sazrijevanju životinja F_1,

— podaci o funkcionalnim opažanjima u mladunaca i odraslih životinja, ako je primjenljivo,

— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o apsolutnoj i relativnoj masi organa za životinje P i F_1,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis svih histopatoloških nalaza,

— ukupan broj spermatozoida iz repa epididimisa, postotak progresivno pokretljivih spermatozoida, postotak morfološki normalnih spermatozoida i postotak spermatozoida po svakoj identificiranoj anomaliji za mužjake P i F_1,

— broj i faze sazrijevanja folikula iz jajnika ženki P i F_1, prema potrebi,

— nabrajanje žutih tijela u jajnicima ženki F_1,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Parametri 2. kohorte

— detaljan opis postupaka upotrijebljenih za standardizaciju opažanja i postupaka, kao i operativne definicije za bodovanje opažanja,

— popis svih upotrijebljenih ispitnih postupaka i obrazloženje za njihovu upotrebu,

— pojedinosti o upotrijebljenim bihevioralnim/funkcionalnim, neuropatološkim i morfometričkim postupcima, uključujući informacije i pojedinosti o automatskim uređajima,

— postupci za kalibriranje i osiguranje istovjetnosti uređaja i ujednačavanje skupina za tretiranje u ispitnim postupcima,

— kratko obrazloženje svih odluka koje uključuju stručno mišljenje,

— detaljan opis svih bihevioralnih/funkcionalnih, neuropatoloških i morfometričkih nalaza po spolu i skupini za doziranje, uključujući povećanja i smanjenja u usporedbi s kontrolnim skupinama,

— masa mozga,

— sve dijagnoze postavljene na temelju neuroloških znakova i lezija, uključujući prirodne bolesti ili stanja,

— slike egzemplarnih nalaza,

— mikroskopske slike za procjenu homologije sekcija upotrijebljenih za morfometriju,

▼M5

— statistički tretman rezultata, uključujući statističke modele upotrijebljene za analizu podataka te rezultati neovisno o tome jesu li značajni ili ne,

— utjecaj ostalih toksičnih učinaka na zaključak o neurotoksičnom potencijalu ispitivane kemikalije po spolu i skupini za doziranje,

— utjecaj toksikokinetičkih informacija na zaključke,

— podaci kojima se potvrđuju pouzdanost i osjetljivost ispitne metode (npr. pozitivni i povijesni kontrolni podaci),

— odnosi, ako postoje, između neuropatoloških i funkcionalnih učinaka,

— vrijednosti kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL) ili referentna doza za ženke i potomke po spolu i skupini za doziranje,

— rasprava o ukupnom tumačenju podataka na temelju rezultata, uključujući zaključak o tome je li razvojna neurotoksičnost posljedica kemikalije ili ne te o vrijednostima kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL).

Parametri 3. kohorte

— titri antitijela iz seruma IgM (senzitizacija na SRBC ili KLH), ili IgM PFC jedinice slezenskog IgM (senzitizacija na SRBC),

— funkcioniranje metode TDAR trebao bi prvi put tijekom postupka optimizacije potvrditi laboratorij koji je započeo ispitivanje, a potom periodički (npr. jednom godišnje) svi laboratoriji,

— rasprava o ukupnom tumačenju podataka na temelju rezultata, uključujući zaključak o tome je li razvojna imunotoksičnost posljedica ispitivane kemikalije ili ne te o vrijednostima kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL).

Rasprava o rezultatima

Zaključci, uključujući vrijednosti kod kojih nisu zamijećeni štetni učinci (NOAEL) na roditelje i potomstvo

Treba dostaviti i sve informacije koje nisu dobivene tijekom studije, ali koje su korisne za tumačenje rezultata (npr. sličnosti učinaka s bilo kojom poznatom toksičnom tvari.

Tumačenje rezultata

80. Produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji pružit će, prema potrebi, informacije o učincima ponavljanog izlaganja nekoj kemikaliji tijekom svih faza reproduktivnog ciklusa. Točnije, studija pruža informacije o reproduktivnom sustavu i o razvoju, rastu i funkcionalnim krajnjim točkama potomaka do 90. postnatalnog dana.

81. Tumačenjem rezultata studije treba uzeti u obzir sve dostupne informacije o kemikaliji, uključujući fizikalno-kemijska, toksikokinetička i toksikodinamička svojstva, dostupne relevantne informacije o strukturnim analozima te rezultate ranije provedenih studija toksičnosti s ispitivanom kemikalijom (npr. studije akutne toksičnosti, toksičnosti nakon ponovljene primjene i mehanizma te studije kojima se procjenjuje postoje li bitne kvalitativne i kvantitativne razlike među vrstama s obzirom na metabolička svojstva in vivo/in vitro). Po mogućnosti rezultate makroskopske nekropsije i vaganja organa treba procijeniti u kontekstu opažanja iz drugih studija s ponovljenom dozom. Usporavanja rasta potomaka moguće je razmotriti u odnosu na utjecaj ispitivane kemikalije na sastav mlijeka (29).

▼M5

2. kohorta (razvojna neurotoksičnost)

82. Neurobihevioralne i neuropatološke rezultate treba tumačiti u kontekstu svih nalaza na temelju dokaza i stručne prosudbe. Treba raspravljati o uzorcima bihevioralnih i morfoloških nalaza, ako postoje te dokazima u pogledu doze-reakcije. U tu karakterizaciju treba uključiti procjenu razvojne neurotoksičnosti, uključujući epidemiološke studije na ljudima ili izvješća o slučajevima te eksperimentalne studije na životinjama (npr. toksikokinetički podaci, informacije o strukturnoj aktivnosti, podaci iz ostalih studija toksičnosti). Procjenom podataka treba obuhvatiti i raspravu o biološkom i statističkom značaju. Procjena bi trebala uključivati odnos, ako postoji, između uočenih neuropatoloških i bihevioralnih promjena. Za smjernice o tumačenju rezultata razvojne neurotoksičnosti vidjeti ispitnu metodu B.53 (35) i Tyl et al., 2008. (31).

3. kohorta (razvojna imunotoksičnost)

83. Slabljenje ili poboljšanje imunološke funkcije iz procjene TDAR-a (reakcija antitijela ovisnih o T-stanicama) treba procijeniti u kontekstu svih obavljenih opažanja. Značaj ishoda TDAR-a moguće je potvrditi ostalim učincima na imunološki povezane indikatore (npr. celularnost koštane srži), masa i histopatologija limfnih tkiva, distribucija podsustava limfocita). Učinci utvrđeni TDAR-om mogu biti manje značajni u slučaju ostalih uočenih toksičnosti pri nižim koncentracijama izlaganja.

84. Za pomoć pri tumačenju reprodukcije i rezultata neurotoksičnosti (26) treba konzultirati OECD-ovu Smjernicu 43.

LITERATURA

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006.), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology, 36., 69. – 98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999.), Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets, Lab. Anim. Sci., 49., 530. – 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003.), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005.), Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group, International Journal of Toxicology, 24., 87. – 94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999.), Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment, Toxicological Sciences, 49., 1. – 4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995.), Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey, Journal of the American College of Toxicologists, 14., 293. – 327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003.), Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37., 356. – 369.

▼M5

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000.). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies, Journal of Toxicological Sciences, 25., 1. – 21.

(9) Creasy, D.M. (2003.), Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology, Birth Defects Research, Part B, 68., 408. – 415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007.), The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84. – 97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979.), Cycles and Seasons, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999.), Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383. – 390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977.), Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat, Biological Reproduction, 17., 298. – 303.

(14) Ladics, G.S. (2007.), Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing, Methods, 41., 9. – 19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004.), Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation, Toxicology, 197., 23. – 35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989.), A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat, Fundamental and Applied Toxicology, 12., 92. – 108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978.), Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats, Journal of Reproduction and Fertility, 54., 103. – 107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991.), The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology, 5., 39. – 44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996.), Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report, Reproductive Toxicology, 10., 237. – 244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992.), Methods for Assessing Rat Sperm Motility, Reproductive Toxicology, 6., 267. – 273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992.), Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration, Journal of Andrology, 13., 409. – 421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991.), Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations, Reproductive Toxicology, 5., 449. – 458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993.), Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer, Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida. str. 319. – 333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989.), The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations, Journal of Andrology, 10., 401. – 415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992.), Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants, Reproductive Toxicology, 6., 491. – 505.

(26) OECD (2008.), Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Pariz.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987.), Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, Journal of Andrology, 8., 330. – 337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006.), A „Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today, Toxicological Pathology, 34., 296. – 313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006.), Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components, Food Chemicals Toxicology, 44., 8. – 16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007.), Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats, Environmental health perspectives, 115(12), 1717. – 1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008.), Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints, Neurotoxicology and Teratology, 30: 349. – 381.

(32) OECD (1996.), Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Pariz.

(33) Poglavlje B.43. ovog Priloga, Studija neurotoksičnosti u glodavaca

(34) OECD (2000.), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(35) Poglavlje B.53. ovog Priloga, Studija razvojne neurotoksičnosti.

(36) Poglavlje B.54. ovog Priloga, Uterotropni biotest na glodavcima: Kratkoročni test probira na estrogenska obilježja.

(37) Poglavlje B.55. ovog Priloga, Hershbergerov biotest na glodavcima Kratkoročni test probira na (anti)androgenska svojstva.

▼**M5**

(38) OECD (2009.), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Pariz.

(39) OECD (2011.), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Pariz.

(40) OECD (2013.), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Pariz.

▼**M5**

Dodatak 1.

Vrijednosti i opažanja uključeni u funkcionalno-opservacijsku bateriju (kohorta 2.A)

Kavez u kojem se drže životinje i otvoreno područje	Manipulativni	Fiziološki
Držanje	Lakoća uklanjanja	Temperatura
Nevoljni klonički i tonički pokreti	Lakoća rukovanja	Tjelesna masa
Zatvaranje kapaka	Mišićni tonus	Reakcije zjenica
Piloerekcija	Reakcija na pristupanje	Veličina zjenica
Slinjenje	Reakcija na dodir	
Izlučivanje suza	Reakcija na buku	
Vokalizacije	Reakcija na štipanje repa	
Kretanje unatrag	Reakcija na uspravljanje	
Abnormalnosti u hodu	‚Spuštenost stopala'	
Uzbuđenje	Snaga prednjih udova	
Stereotipi	Snaga stražnjih udova	
Neobično ponašanje		
Mrlje		
Respiratorne abnormalnosti		

▼**M5**

Dodatak 2.

DEFINICIJE

Kemikalija: Tvar ili smjesa.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju tom ispitnom metodom.

▼M5

B.57. TEST STEROIDOGENEZE H295R

UVOD

1. Ova je ispitna metoda istovjetna Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 456 (2011.). OECD je u 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija iz 2002. sastoji se od pet razina, pri čemu svaka razina odgovara drugoj razini biološke složenosti (1). U testu steroidogeneze H295R in vitro koji se opisuje ovom ispitnom metodom upotrebljava se stanična linija humanog adrenokarcinoma (stanice NCI-H295R), a on predstavlja 2. liniju „testa in vitro kojim se dobivaju mehanički podaci" koje treba upotrebljavati kod probira i rangiranja. Razvoj i standardizacija testa kao probira za kemijske učinke steroidogeneze, osobito na proizvodnju 17β-estradiola (E2) i testosterona (T), provedeni su u nekoliko faza. Test H295R optimiziran je i validiran (2) (3) (4) (5).

2. Cilj je testa steroidogeneze H295R otkriti kemikalije koje utječu na proizvodnju hormona E2 i T. Test H295R namijenjen je otkrivanju ksenobiotika čija su ciljna mjesta endogene komponente koje predstavljaju međustanični biokemijski put koji počinje od niza reakcija od kolesterola do proizvodnje hormona E2 i/ili T. Test H295R nije namijenjen otkrivanju kemikalija koje utječu na steroidogenezu zbog učinaka na os hipotalamus-hipofiza-gonada. Cilj je testa pružiti odgovor DA/NE s obzirom na potencijal kemikalije da potakne ili spriječi proizvodnju hormona T i E2. Međutim, u nekim je slučajevima moguće dobiti kvantitativne rezultate. Rezultati testa izražavaju se kao relativne promjene u proizvodnji hormona u usporedbi s kontrolama otapala. Cilj testa nije pružanje specifičnih mehaničkih podataka o interakciji ispitivane kemikalije i endokrinog sustava. Istraživanja su provedena upotrebom stanične linije za utvrđivanje učinaka na specifične enzime i hormone posrednike poput progesterona (2).

3. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku. Detaljan protokol, uključujući upute za pripremanje otopina, kultiviranje stanica i provođenje raznih aspekata ispitivanja, dostupan je kao dodaci I–III. OECD-ova dokumenta,Višelaboratorijska validacija testa steroidogeneze H295R radi utvrđivanja modulatora proizvodnje testosterona i estradiola (4).

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Pet različitih enzima koji kataliziraju šest različitih reakcija uključeno je u biosintezu spolnog steroidnog hormona. Enzimatska konverzija kolesterola u pregnenolon s pomoću enzima odvajanja bočnog lanca kolesterola (CYP11A) citokroma P450 (CYP) predstavlja prvi korak u nizu biokemijskih reakcija čiji je vrhunac sinteza steroidnih krajnjih proizvoda. Ovisno o redu sljedeće dvije reakcije, steroidogenski put dijeli se na dva puta, put Δ^5-hidroksisteroida i put Δ^4-ketosteroida koji se približavaju kod proizvodnje androstendiona (slika 1.).

5. Androstendion se pretvara u testosteron (T) s pomoću 17β-hidroksisteroid-dehidrogenaze (17β-HSD). Testosteron je i hormon posrednik i krajnji hormonom. U mužjaka se može pretvoriti u dihidrotestosteron (DHT) s pomoću 5α-reduktaze, koja se nalazi u staničnim membranama, jezgrenoj ovojnici i endoplazmatskom retikulumu ciljnih tkiva androgenskog djelovanja poput prostate i sjemenih vezikula. DHT je znatno potentniji kao androgen u usporedbi s testosteronom te se smatra i krajnjim hormonom. Testom H295R ne mjeri se DHT (vidjeti stavak 10.).

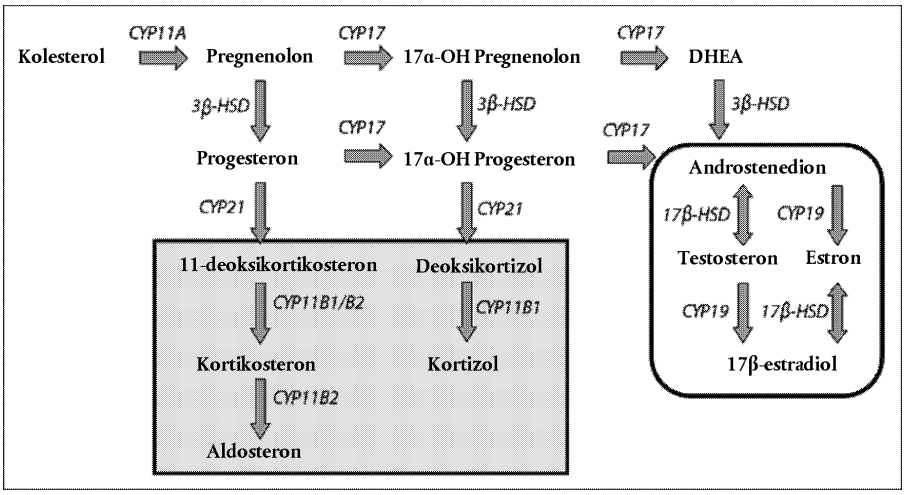
▼M5

6. Aromataza (CYP19) jest enzim na steroidogenskom putu kojim se androgenske kemikalije pretvaraju u estrogenske. Njome se testosteron pretvara u 17β-estradiol (E2), a androstendion u estron. Hormoni E2 i T smatraju se krajnjim hormonima steroidogenskog puta.

7. Specifičnost djelovanja liaze aromataze CYP17 razlikuje se za supstrate posrednike među vrstama. U ljudi enzim favorizira supstrate puta Δ^5-hidroksisteroida (pregnenolon), dok su u štakora poželjniji supstrati na putu Δ^4-ketosteroida (progesteron) (19). Takvim razlikama u aktivnosti liaze aromataze CYP17 mogu se objasniti neke razlike u reakciji na kemikalije kojima se mijenja steroidogeneza in vivo prema vrstama (6). Dokazano je da su stanice H295 najsličnije adrenalnoj ekspresiji enzima i uzorku proizvodnje steroida u odraslih ljudi (20), ali je poznato da one izražavaju enzime za putove Δ^5-hidroksisteroida i Δ^4-ketosteroida za sintezu androgena (7) (11) (13) (15).

Slika 1.

Steroidogenski put u stanicama H295R



Napomena:

Enzimi su u kurzivu, hormoni su podebljani, a strelice ukazuju na smjer sinteze. Siva pozadina predstavlja putove/proizvode kortikosteroida. Putovi/proizvodi spolnih steroida su zaokruženi. CYP = citokrom P450; HSD = hidroksisteroid-dehidrogenaza; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Stanična linija humanog adrenokarcinoma (H295R) koristan je model in vitro za ispitivanje učinaka na sintezu steroidnih hormona (2) (7) (8) (9) (10). Stanična linija H295R izražava gene koji kodiraju sve gore navedene ključne enzime za steroidogenezu (11) (15) (slika 1.). To je jedinstveno obilježje jer je ekspresija tih gena in vivo specifična za tkivo i razvojnu fazu, uz u pravilu više tkiva i razvojnih faza koji izražavaju sve gene uključene u steroidogenezu (2). Stanice H295R odlikuju se fiziološkim karakteristikama zonski nediferenciranih humanih fetalnih adrenalnih stanica (11). Stanice predstavljaju jedinstveni sustav in vitro s obzirom na to da se odlikuju sposobnošću proizvodnje svih steroidnih hormona koji se nalaze u odraslome adrenalnom korteksu i gonadama, čime se omogućava ispitivanje učinaka na sintezi kortikosteroida i proizvodnju spolnih steroidnih hormona poput androgena i estrogena, iako je test validiran samo za otkrivanje hormona T i E2. Promjene zabilježene ispitnim sustavom u obliku promjene u proizvodnji hormona T i E2 mogu biti posljedica brojnih interakcija ispitivanih kemikalija i steroidogenih funkcija

▼M5

izraženih stanicama H295R. One uključuju modulaciju ekspresije, sintezu ili funkciju enzima uključenih i proizvodnju, transformaciju ili eliminaciju steroidnih hormona (12) (13) (14). Razlozi inhibicije proizvodnje hormona mogu biti izravno konkurentsko povezivanje s enzimom na putu, učinak na sučimbenike poput NADPH-a (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) i cAMP-a (ciklički adenozin monofosfat) i/ili porast metabolizma steroida ili suzbijanje ekspresije gena određenih enzima na putu steroidogeneze. Iako inhibicija može biti funkcija izravnih ili neizravnih postupaka uključenih u proizvodnju hormona, indukcija je u pravilu neizravnog karaktera, poput utjecaja na sučimbenike poput NADPH-a i cAMP-a (kao u slučaju forskolina), smanjenja metabolizma steroida (13) i/ili pospješivanja steroidogenske ekspresije gena.

9. Test H295R ima nekoliko prednosti:

— njime se omogućava otkrivanje povećanja i smanjenja proizvodnje hormona T i E2,

— njime se dopušta izravna procjena potencijalnog učinka kemikalije na vitalnost/citotoksičnost stanice. To je važno obilježje jer se njime omogućava razlikovanje učinaka koji su posljedica citotoksičnosti i onih koji su posljedica izravne interakcije kemikalija i steroidogenskih putova, što nije moguće u sustavima u kojima se upotrebljavaju eksplantati tkiva koji se sastoje od brojnih vrsta stanica različitih osjetljivosti i funkcionalnosti,

— za njegovo provođenje nisu potrebne životinje,

— stanična linija H295R komercijalno je dostupna.

10. Načelna su ograničenja testa kako slijedi:

— nepoznat je njegov metabolički kapacitet, ali je vjerojatno vrlo ograničen. Stoga će kemikalije koje treba metabolički aktivirati vjerojatno biti izostavljene iz ovog testa.

— s obzirom na to da nastaje iz adrenalnog tkiva, H295R se dolikuje enzimima sposobnima za proizvodnju glukokortikoida i mineralnih kortikoida, kao i spolnih hormona. Stoga bi učinci na proizvodnju glukokortikoida i mineralnih kortikoida mogli utjecati na razine hormona T i E2 uočene u testu,

— njime se ne mjeri DHT i zato se ne očekuje da se njime otkriju kemikalije koje inhibiraju 5α-reduktazu, za što se može upotrebljavati Hershbergerov test (16),

— testom H295R neće se otkriti kemikalije koje ometaju steroidogenezu tako da utječu na os hipotalamus-hipofiza-gonada jer se nju može ispitivati samo na netaknutim životinjama.

NAČELO TESTA

11. Namjena je testa otkrivanje kemikalija koje utječu na proizvodnju hormona T i E2. Testosteron je i hormon posrednik na putu proizvodnje hormona E2. Testom se mogu otkriti kemikalije kojima se u pravilu inhibiraju ili induciraju enzimi puta steroidogeneze.

▼M5

12. Test se obično provodi u standardnim uvjetima stanične kulture na pločicama za uzgoj kulture s 24 jažice. Alternativno, za provođenje testa mogu se upotrebljavati i druge veličine pločica. Međutim, uvjete razmnožavanja i pokusa treba odgovarajuće prilagoditi kako bi se kriteriji učinka i dalje primjenjivali.

13. Nakon razdoblja aklimatizacije u trajanju od 24 sata na pločicama s višestrukim jažicama, stranice se 48 sati izlaže sedam koncentracija ispitivane kemikalije u najmanje tri primjerka. Otapalo i poznati inhibitor i induktor proizvodnje hormona dodaju se u fiksnoj koncentraciji kao negativne i pozitivne kontrole. Na kraju razdoblja izlaganja iz svake se jažice uklanja medij. Vitalnost stanica u svakoj jažici analizira se neposredno nakon uklanjanja medija. Koncentracije hormona u mediju moguće je izmjeriti raznim metodama, uključujući komercijalno dostupne komplete za mjerenje hormona i/ili instrumentalnim tehnikama poput masene spektrometrije s tekućinskom kromatografijom (LC-MS). Podaci su izraženi kao promjena omjera u odnosu na kontrolu otapala i najnižu koncentraciju s vidljivim učinkom (LOEC). Ako je test negativan, najviša ispitivana koncentracija navodi se kao koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC). Zaključke o sposobnosti kemikalije da utječe na steroidogenezu treba temeljiti na najmanje dva neovisna ispitivanja. Prvo ispitivanje može služiti za utvrđivanje raspona, uz naknadnu prilagodbu koncentracija za drugo i treće ispitivanje ako dođe do problema radi topljivosti ili citotoksičnosti ili ako se čini da je djelovanje kemikalije pri kraju raspona ispitivanih koncentracija.

POSTUPAK U POGLEDU KULTURA

Stanična linija

14. Stanice NCI-H295R mogu se kupiti od centra American Type Culture Collections (ATCC) nakon potpisa ugovora o prijenosu materijala ([1]).

Uvod

15. Zbog promjena kapaciteta za proizvodnju hormona E2 stanica zbog starenja/prolaza (2), stranice prije upotrebe treba kultivirati u skladu s posebnim protokolom te treba zabilježiti broj prolaza od odmrzavanja stanica, kao i broj prolaza kod zamrzavanja stanica i njihova smještaja u spremnik s tekućim dušikom. Prvi broj odnosi se na stvarni broj staničnih prolaza, dok se drugi odnosi na broj prolaza kod zamrzavanja stanica i njihova smještaja u spremnik. Primjerice, stanice koje su smrznute nakon petog prolaza i odmrznute te potom podijeljene tri puta (četiri prolaza, pri čemu su svježe odmrznute stanice prvi prolaz) nakon ponovne kultivacije imale bi oznaku prolaz 4,5. Primjer sheme za označivanje brojevima opisuje se u Dodatku 1. izvješću o validaciji (4).

16. Osnovni se medij upotrebljava kao osnova za dopunjene medije i medije za zamrzavanje. Dopunjeni je medij nužna komponenta za kultivaciju stanica. Medij za zamrzavanje posebno je namijenjen zamrzavanju stranica bez posljedica radi dugotrajnog čuvanja. Prije upotrebe treba analizirati nu-serum (ili usporedivi serum jednakih svojstava za koji je dokazano da daje podatke u skladu sa zahtjevima u pogledu provođenja ispitivanja i kontrole kvalitete), koji je sastavni dio dopunjenih medija, radi osnovnih koncentracija hormona T i E2. Priprema tih otopina opisuje se u Dodatku 1. izvješću o validaciji (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, (http://www.lgcstandards-atcc.org/).

▼M5

17. Nakon inicijacije stanične kulture H295R iz prvotne ATCC-ove serije, stanice treba uzgajati za pet prolaza (tj. stanice se dijele 4 puta). Stanice petog prolaza potom se zamrzavaju u spremniku s tekućim dušikom. Prije zamrzavanja stanica uzorak prethodnih stanica četvrtog prolaza stavlja se na pločicu za kontrolu kvalitete (vidjeti stavke 36. i 37.) kako bi se potvrdilo jesu li osnovna proizvodnja hormona i reakcija na pozitivne kontrolne kemikalije u skladu s kriterijima kontrole testa kako su definirani u tablici 5.

18. Stanice H295R treba kultivirati, zamrznuti i pohraniti u tekućem dušiku kako bi se osiguralo da su one uvijek stanice odgovarajućeg prolaza/starosti za kultivaciju i upotrebu. Najveći broj prolaza nakon uzimanja nove ([1]) ili zamrznute ([2]) serije stanica u kulturu koji je prihvatljiv za upotrebu u testu H295R ne smije premašiti deset. Primjerice, prihvatljivi bi prolazi za stanične kulture iz serije zamrznute kod petog prolaza bili 4,5 do 10,5. Za stanice započete iz tih zamrznutih serija treba slijediti postupak iz stavka 19. Te stanice treba kultivirati za najmanje četiri (4) dodatna prolaza (prolaz 4,5) prije njihove upotrebe u ispitivanju.

Započinjanje stanica iz zamrznute zalihe

19. Postupak za započinjanje stanica iz zamrznute zalihe treba upotrebljavati kad se nova serija stanica vadi iz spremnika s tekućim dušikom radi kultivacije i ispitivanja. Pojedinosti o ovom postupku navedene su u Dodatku III. izvješću o validaciji (4). Stanice se vade iz spremnika s tekućim dušikom, ubrzano odmrzavaju, smještaju u dopunjeni medij u kivetu za centrifugiranje, centrifugiraju na sobnoj temperaturi, ponovno suspendiraju u dopunjenom mediju te premještaju u tikvicu s kulturom. Medij treba promijeniti sljedećeg dana. Stanice H295R kultiviraju se u inkubatoru na 37 °C s 5 %-tnim CO_2 u zraku, a medij se obnavlja 2 do 3 puta tjedno. Kad su stanice približno 85 – 90 % konfluentne, treba ih podijeliti. Dijeljenje stanica nužno je radi osiguranja zdravlja i rasta stanica te čuvanja stanica za provođenje biotestova. Stanice se tri puta ispiru fiziološkom otopinom s fosfatnim pulferom (bez Ca^{2+} Mg^{2+}) i oslobađaju iz tikvice s kulturom dodavanjem odgovarajućeg enzima za odvajanje, npr. tripsina u fiziološku otopinu s fosfatnim pulferom (bez Ca^{2+} Mg^{2+}). Neposredno nakon odvajanja stanica od tikvice s kulturom treba zaustaviti djelovanje enzima dodavanjem dopunjenog medija u omjeru trostrukog volumena upotrijebljenog za tretman enzimom. Stanice se stavljaju u kivetu za centrifugiranje, centrifugiraju se na sobnoj temperaturi, uklanja se supernatant te se stanični talog ponovno suspendira u dopunjenom mediju. Odgovarajuća količina otopine stanica stavlja se u novu tikvicu s kulturom. Količinu otopine stanica treba prilagoditi tako da su stanice konfluentne u roku od 5 do 7 dana. Preporučeni je omjer potkultivacije 1:3 do 1:4. Pločicu treba pažljivo označiti. Stanice su sada spremne za upotrebu u testu, a višak stanica treba zamrznuti u tekućem dušiku kako je opisano u stavku 20.

([1]) „Nova serija” odnosi se na svježu seriju stanica dobivenih od ATCC-a.

([2]) „Zamrznuta serija” odnosi se na stanice koje su prije kultivirane i potom zamrznute u laboratoriju koji nije ATCC.

▼M5

Zamrzavanje stanica H295R (priprema stanica za čuvanje u tekućem dušiku)

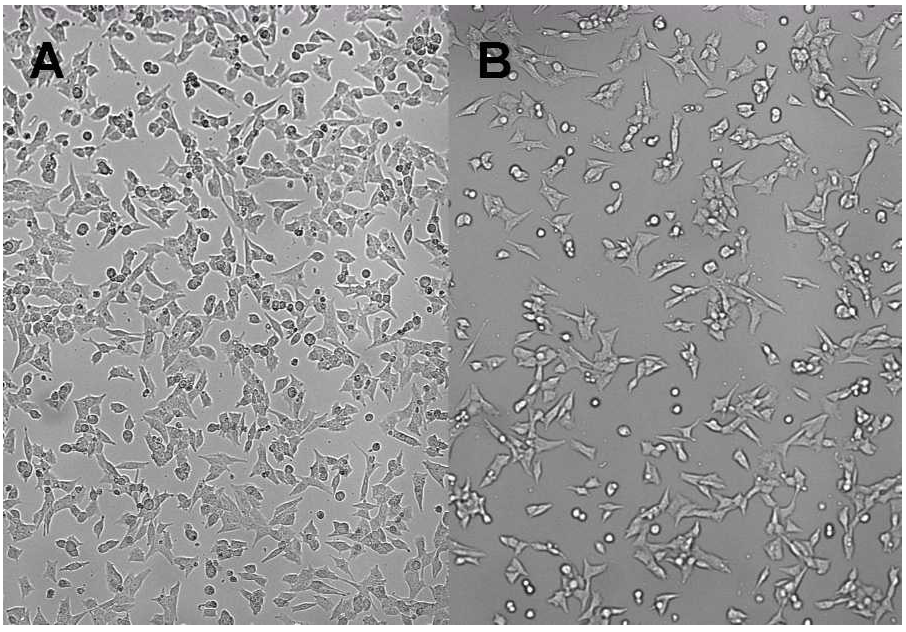
20. Kod pripreme stanica H295R za zamrzavanje treba slijediti gore opisani postupak za dijeljenje stanica do koraka za ponovnu suspenziju staničnog taloga s dna kivete za centrifugiranje. Ovdje se stanični talog ponovno suspendira u mediju za zamrzavanje. Otopina se premješta u kriogenu posudu, odgovarajuće označava te 24 sata zamrzava na – 80 °C, nakon čega se kriogena posuda stavlja u spremnik s tekućim dušikom. Pojedinosti o ovom postupku navedene su u Dodatku III. izvješću o validaciji (4).

Nanošenje na pločice i preinkubacija stanica za ispitivanje

21. Broj potrebnih pločica s 24 jažice pripremljenih kako se navodi u stavku 19. ovisi o broju kemikalija koje treba ispitati i konfluenciji stanica u posudama s kulturom. U pravilu, jedna tikvica s kulturom (75 cm^2) 80 – 90 % konfluentnih stanica imat će dovoljno stanica za jednu do 1,5 pločicu (24 jažice) ciljne gustoće od 200 000 do 300 000 stanica po ml medija, što će dovesti do konfluencije od 50 – 60 % u jažicama u 24 sata (slika 2.). To je u pravilu optimalna gustoća stanica za proizvodnju hormona u testu. Pri većim gustoćama mijenjaju se uzorci proizvodnje hormona T i E2. Prije prvog provođenja testa preporučuje se ispitivanje različitih gustoća razmnožavanja između 200 000 i 300 000 stanica po ml te odabir gustoće za konfluenciju od 50 – 60 % u jažici tijekom 24 sata.

Slika 2.

Fotomikrograf stanica H295R pri gustoći razmnožavanja od 50 % na pločici s 24 jažice u 24 sata zabilježen na rubu (A) i u središtu (B) jažice.



22. Medij se pipetom vadi iz tikvice s kulturom, stanice se ispiru tri puta sterilnom fiziološkom otopinom s fosfatnim pulferom (bez Ca^{2+} Mg^{2+}). Otopina enzima (u fiziološkoj otopini s fosfatnim pulferom (bez Ca^{2+} Mg^{2+}) dodaje se radi odvajanja stanica od tikvice s kulturom. Nakon odgovarajućeg vremenskog razdoblja za odvajanje stanica treba zaustaviti djelovanje enzima dodavanjem dopunjenog medija u omjeru trostrukog volumena upotrijebljenog za tretman enzimom. Stanice se stavljaju u kivetu

▼M5

za centrifugiranje, uklanja se supernatant te se stanični talog ponovno suspendira u dopunjenom mediju. Gustoća stanica izračunava se s pomoću, primjerice, hemocitometra ili brojača stanica. Otopinu stanica treba razrijediti do željene gustoće za nanošenje na pločice i temeljito promiješati kako bi se osigurala homogenost gustoće stanica. 1 ml otopine stanica po jažici treba nanijeti na pločicu te označiti pločice i jažice. Pločice na koje su nanesene stanice podvrgavaju se inkubaciji u trajanju od 24 sata pri 37 °C s 5 %-tnim CO_2 u zraku kako bi se stanice mogle pričvrstiti na jažice.

ZAHTJEVI U POGLEDU KONTROLE KVALITETE

23. Ključno je dodavanje točnih količina otopina i uzoraka u jažice tijekom doziranja jer se na taj način utvrđuju koncentracije koje se upotrebljavaju u izračunima rezultata testa.

24. Svaki bi laboratorij prije započinjanja stanične kulture i bilo kakvog naknadnog ispitivanja trebao dokazati osjetljivost svog sustava mjerenja hormona (stavci 29. do 31.).

25. Ako se upotrebljavaju testovi mjerenja hormona na temelju antitijela, kemikalije koje treba ispitati prije prvog ispitivanja treba analizirati s obzirom na njihov potencijal narušavanja sustava mjerenja koji se upotrebljava za mjerenje hormona T i E2 kako je navedeno u stavku 32.

26. DMSO je preporučeno otapalo za test. Ako se upotrebljava alternativno otapalo, treba utvrditi sljedeće:

— topljivost ispitivane kemikalije, forskolina i prokloraza u otapalu,

— citotoksičnost kao funkciju koncentracije otapala.

Preporučuje se da najveća dopuštena koncentracija otapala ne premašuje deseterostruku najmanju citotoksičnu koncentraciju otapala.

27. Prije prvog ispitivanja laboratorij bi trebao provesti kvalifikacijski pokus kojim dokazuje svoju sposobnost održavanja i postizanja odgovarajućih uvjeta u pogledu stanične kulture i pokusa nužnih za ispitivanje kemikalije kako je opisano u stavcima 33. do 35.

28. Pri pokretanju ispitivanja na novoj seriji kontrolnu pločicu treba ispitati prije upotrebe nove serije kako bi se ocijenio učinak stanica kako je opisano u stavcima 36. i 37.

Učinak sustava mjerenja hormona

Osjetljivost, točnost i preciznost metode i unakrsna reaktivnost s matricom uzorka

29. Svaki laboratorij može za analizu proizvodnje hormona T i E2 stanica H295R upotrebljavati sustav mjerenja hormona po izboru u skladu s kriterijima učinka, uključujući granicu kvantifikacije (LOQ). Nominalno oni iznose 100 pg/ml za hormon T i 10 pg/ml za hormon E2, koji se temelje na osnovnim razinama hormona iz validacijskih studija. Međutim, više ili niže razine mogu biti odgovarajuće ovisno o osnovnim razinama hormona ostvarenima u laboratoriju koji provodi ispitivanje. Prije prve upotrebe pločice za kontrolu kvalitete i početka ispitivanja laboratorij bi trebao analizom dopunjenog medija s dodatkom interne hormonske kontrole dokazati da se hormonskim testom koji treba upotrebljavati mogu mjeriti koncentracije hormona u dopunjenom mediju dovoljno točno i precizno u skladu s kriterijima za kontrolu kvalitete navedenima u tablicama 1. i 5. U dodatni medij treba dodati najmanje tri koncentracije svakog hormona (npr. 100, 500 i 2 500 pg/ml hormona T, odnosno 10, 50 i 250 pg/ml hormona E2; ili je za najniže koncentracije dodatka za hormone T i E2 moguće

▼M5

upotrijebiti najniže moguće koncentracije na temelju graničnih vrijednosti otkrivanja odabranog sustava mjerenja hormona) i analizirati. Izmjerene koncentracije hormona neekstrahiranih uzoraka trebale bi biti unutar 30 % nominalnih koncentracija, a varijacije između ponovljenih mjerenja istog uzorka ne smiju premašivati 25 % (vidjeti i tablicu 8. za dodatne kriterije u pogledu kontrole kvalitete). Ako su ti kriteriji u pogledu kontrole kvalitete ispunjeni, pretpostavlja se da je odabrani test mjerenja hormona dovoljno točan, precizan te da nije unakrsno reaktivan s komponentama u mediju (matrica uzorka) tako da bi se mogao očekivati znatan utjecaj na ishod testa. U tom slučaju nije potrebna ekstrakcija uzoraka prije mjerenja hormona.

30. U slučaju da kriteriji u pogledu kontrole kvalitete iz tablica 1. i 8. nisu ispunjeni, može doći do znatnog učinka matrice te treba provesti pokus s pomoću ekstrahiranog medija s dodatkom. Primjer postupka ekstrakcije opisuje se u Dodatku 2. izvješću o validaciji (4). Mjerenja koncentracija hormona u ekstrahiranim uzorcima treba provesti u tri primjerka ([1]). Ako se može dokazati da nakon ekstrakcije komponente medija ne ometaju metodu otkrivanja hormona kako je definirana kriterijima za kontrolu kvalitete, sva daljnja ispitivanja treba provoditi upotrebljavajući ekstrahirane uzorke. Ako je kriterije za kontrolu kvalitete nemoguće ispuniti nakon ekstrakcije, upotrijebljeni sustav mjerenja hormona ne odgovara svrsi testa steroidogeneze H295R te treba upotrijebiti drugu metodu otkrivanja hormona.

Standardna krivulja

31. Koncentracije hormona kontrola otapala trebale bi se nalaziti unutar linearnog dijela standardne krivulje. Poželjno je da se vrijednosti kontrola otapala nalaze blizu središta linearnog dijela kako bi se osigurala mogućnost mjerenja indukcije i inhibicije sinteze hormona. Otopine medija (ili ekstrakata) koje treba mjeriti treba odabrati u skladu s tim. Linearni odnos treba utvrditi odgovarajućim statističkim pristupom.

Ispitivanje interferencije kemikalije

32. Ako će se za mjerenje hormona upotrebljavati testovi na osnovi antitijela poput imunoenzimskih testova (ELISA) i radioimunoloških testova (RIA), svaku kemikaliju prije početka stvarnog ispitivanja kemikalija treba ispitati radi potencijalne interferencije sa sustavom mjerenja hormona koji treba upotrijebiti (Dodatak III. izvješću o validaciji (4)) zato što neke kemikalije mogu ometati navedena ispitivanja (17). Ako interferencija iznosi ≥ 20 % osnovne proizvodnje hormona T i E2 utvrđene analizom hormona, treba provesti ispitivanje interferencije testa hormona kemikalije (kako je opisano

([1]) *Napomena:* Ako je potrebna ekstrakcija. za svaki se ekstrakt obavljaju tri ponovljena mjerenja. Svaki će se uzorak ekstrahirati samo jednom.

▼M5

u odjeljku 5.0 Dodatka III. izvješću o validaciji (4)) na svima osnovnim otopinama ispitivane kemikalije kako bi se utvrdila granična doza pri kojoj dolazi do znatne interferencije (≥ 20 %). Ako interferencija iznosi manje od 30 %, podaci se mogu ispraviti za interferenciju. Ako interferencija iznosi više od 30 %, podaci su nevažeći te treba odbaciti podatke pri tim koncentracijama. Ako do znatne interferencije ispitivane kemikalije sa sustavom mjerenja hormona dođe kod više necitotoksičnih koncentracija, treba upotrebljavati drugi sustav mjerenja hormona. Kako bi se izbjegla interferencija kontaminirajućih kemikalija, preporučuje se ekstrakcija hormona iz medija s pomoću odgovarajućeg otapala, a moguće se metode nalaze u izvješću o validaciji (4).

Tablica 1.

Kriteriji učinka za sustave mjerenja hormona

Parametar	Kriterij
Osjetljivost mjerne metode	Granica kvantifikacije (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Učinkovitost ekstrakcije hormona (samo u slučaju potrebe)	Prosječna brzina obnavljanja (na temelju trostrukih mjera) količina hormona s dodatkom ne smije se razlikovati više od 30 % od dodane količine.
Interferencija kemikalije (samo sustavi na temelju antitijela)	Ne smije doći do znatne (≥ 30 % osnovne proizvodnje hormona odgovarajućeg hormona) unakrsne reaktivnosti niti s jednim hormonom koji proizvode stanice ([b]) ([c])

([a]) *Napomena*: Granice mjerne metode temelje se na osnovnim vrijednostima proizvodnje hormona navedenima u tablici 5. i na učinku. Ako je moguće postići veću osnovnu proizvodnju hormona, granica može biti viša.

([b]) Neka antitijela hormona T i E2 mogu unakrsno reagirati s androstendionom, odnosno estronom, u većem postotku. U takvim slučajevima nije moguće točno utvrditi učinke na 17β-HSD. Ipak, podaci mogu pružiti korisne informacije o učincima na proizvodnju estrogena ili androgena općenito. U takvim slučajevima podatke treba izraziti kao reakcije androgena/estrogena, umjesto kao hormone E2 i T.

([c]) To uključuje kolesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoksikortisteron, kortikosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon,17α-progesteron, deoksikortizol, kortizol, DHEA, androstenedion, estron.

Ispitivanje osposobljenosti laboratorija

33. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija laboratorij bi, provođenjem ispitivanja osposobljenosti, trebao dokazati da može postići i održati odgovarajuću staničnu kulturu i ispitne uvjete nužne za uspješno provođenje testa. S obzirom na to da je provođenje testa izravno povezano s osobljem laboratorija koje ga provodi, te postupke treba djelomično ponoviti ako dođe do promjene osoblja.

34. To će se ispitivanje osposobljenosti provesti u jednakim uvjetima navedenima u stavcima 38. do 40. izlaganjem stanica sedam rastućih koncentracija jakih, umjerenih i slabih induktora i inhibitora, kao i negativnoj kemikaliji (vidjeti tablicu 2.) Točnije, kemikalije koje treba ispitati uključuju jaki

▼M5

induktor forskolin (br. CAS 66575-29-9), jaki inhibitor prokloraz (br. CAS 67747-09-5), umjereni induktor atrazin (br. CAS 1912-24-9), umjereni inhibitor aminoglutetimid (br. CAS 125-84-8), slabi induktor (proizvodnja hormona E2) i slabi inhibitor (proizvodnja hormona T), bisfenol A (br. CAS 80-05-7) i negativnu kemikaliju humani korionski gonadotropin (HCG) (br CAS 9002-61-3) kako je navedeno u tablici 2. Za sve se kemikalije upotrebljavaju zasebne pločice s pomoću formata navedenih u tablici 6. Jednu pločicu za kontrolu kvalitete kemikalija za ispitivanje osposobljenosti (tablica 4., stavci 36. i 37.) treba uključiti u svakodnevno ispitivanje.

Tablica 2.

Kemikalije za ispitivanje osposobljenosti i koncentracije izlaganja

Kemikalija za ispitivanje osposobljenosti	Ispitne koncentracije [μM]
Prokloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Kontrola otapala (DMSO) (0), 1 μl DMSO/jažica

Izlaganje stanica H295R kemikalijama za ispitivanje osposobljenosti treba provesti na pločicama s 24 jažice tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija. Doziranje je u μM za sve doze ispitivane kemikalije. Doze treba primijeniti u DMSO-u pri 0,1 % v/v po jažici. Sve ispitne koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama (tablica 6.). Za svaku se kemikaliju upotrebljava zasebna pločica. Jedna pločica za kontrolu kvalitete uključena je u svakodnevno ispitivanje.

35. Analize vitalnosti stanica i hormona treba provoditi kako je predviđeno stavcima 42. do 46. Graničnu vrijednost (najniža koncentracija s vidljivim učinkom, LOEC) i odluku o klasifikaciji treba prijaviti i usporediti s vrijednostima u tablici 3. Podaci se smatraju prihvatljivima ako su u skladu s LOEC-om i klasifikacijom odluke u tablici 3.

Tablica 3.

Granične vrijednosti (LOEC-ovi) i klasifikacije odluke za kemikalije za ispitivanje osposobljenosti

	Br. CAS	LOEC [μM]		Klasifikacija odluke	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a])(inhibicija)	+ (inhibicija)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (indukcija)	+ (indukcija)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcija)	+ (indukcija)
Aminoglute-timid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibicija)	+ (inhibicija)

▼M5

	Br. CAS	LOEC [μM]		Klasifikacija odluke	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibicija)	+ (indukcija)
HCG	9002-61-3	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Negativno	Negativno

([a]) +, pozitivno
Nije primjenjivo: Nije primjenjivo jer ne bi trebalo doći ni do kakvih promjena nakon izlaganja necitotoksičnim koncentracijama negativne kontrole.

Pločica za kontrolu kvalitete

36. Pločica za kontrolu kvalitete upotrebljava se za provjeru učinka stanica H295R u standardnim uvjetima kulture te za uspostavu povijesne baze podataka koncentracija hormona u kontrolama otapala, pozitivnih i negativnih kontrola, kao i ostalih vrijednosti kontrole kvalitete tijekom vremena.

— Učinak stanica H295R treba procjenjivati s pomoću pločice za kontrolu kvalitete za svaku novu ATCC-ovu seriju ili nakon prve upotrebe prethodno zamrznute zalihe stanica, osim ako je ispitivanje osposobljenosti laboratorija (stavci 32. do 34.) provedeno na toj seriji stanica.

— Pločica za kontrolu kvalitete pruža cjelovitu procjenu uvjeta testa (npr. vitalnost stanica, kontrole otapala, negativne i pozitivne kontrole, kao i varijabilnost unutar testa i između testova) kod ispitivanja kemikalija te bi trebala biti dijelom svakog ispitivanja.

37. Ispitivanje kontrole kvalitete provodi se na pločici s 24 jažice te slijedi jednake postupke inkubacije, doziranja, vitalnosti stanica/citotoksičnosti, ekstrakcije i analize hormona opisane u stavcima 38. do 46. za ispitivanje kemikalija. Pločica za kontrolu kvalitete sadržava praznine, kontrole otapala i dvije koncentracije poznatog induktora (forskolin, 1, 10 μM) i inhibitor (prokloraz, 0,1, 1 μM) sinteze hormona E2 i T. Osim toga, MeOH se upotrebljava u odabranim jažicama kao pozitivna kontrola za test vitalnosti/citotoksičnosti. Detaljan opis izgleda pločice naveden je u tablici 4. Kriteriji koje treba ispuniti na pločici za kontrolu kvalitete navedeni su u tablici 5. Minimalnu osnovnu proizvodnju hormona za hormone T i E2 treba postići u kontroli otapala i praznim jažicama.

Tablica 4.

Izgled pločice za kontrolu kvalitete za ispitivanje učinka neizloženih stanica H295R i stanica izloženih poznatim inhibitorima (PRO = prokloraz) i stimulatorima (FOR = forskolin) proizvodnje hormona T i E2. Nakon završetka pokusa s izlaganjem i uklanjanja medija, 70 %-tna otopina metanola dodat će se svim jažicama s metanolom kako bi služile kao pozitivna kontrola za citotoksičnost (vidjeti test citotoksičnosti u Dodatku III. izvješću o validaciji (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Praznina ([a])	Praznina ([a])	Praznina ([a])	Praznina ([a]) (+ MeOH) ([b])	Praznina ([a]) (+ MeOH) ([b])	Praznina ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Stanicama u praznim jažicama dodaje se samo medij (tj. ne dodaje se otapalo).
([b]) Metanol (MeOH) će se dodati nakon završetka izlaganja i uklanjanja medija iz tih jažica.
([c]) Kontrola otapala DMSO (1 μl/jažica).

Tablica 5.

Kriteriji učinka pločice za kontrolu kvalitete

	T	E2
Osnovna proizvodnja hormona u kontroli otapala	≥ 5 puta granica kvantifikacije	≥ 2,5 puta granica kvantifikacije
Indukcija (10 μM forskolina)	≥ 1,5 puta kontrole otapala	≥ 7,5 puta kontrole otapala
Inhibicija (1 μM prokloraza)	≥ 0,5 puta kontrole otapala	≥ 0,5 puta kontrole otapala

POSTUPAK IZLAGANJA KEMIKALIJI

38. Preinkubirane stanice uklanjaju se iz inkubatora (stavak 21.) te se prije doziranja pod mikroskopom provjerava jesu li u dobrom stanju (prianjanje, morfologija).

39. Stanice se stavljaju u kabinet za biološku sigurnost, uklanja se dopunjeni medij i dodaje se novi dopunjeni medij (1 ml/jažica). DMSO je poželjno otapalo za ovu ispitnu metodu. Međutim, ako postoje razlozi za upotrebu drugih otapala, treba opisati znanstvenu podlogu. Stanice se izlažu ispitivanoj kemikaliji dodavanjem 1 μl odgovarajuće osnovne otopine u DMSO-u (vidjeti Dodatak II. izvješću o validaciji (4)) po 1 ml dopunjenog medija (volumen jažice). Posljedica je toga konačna koncentracija od 0,1 % DMSO-a u jažicama. Kako bi se osiguralo odgovarajuće miješanje, u pravilu je poželjno miješanje odgovarajuće osnovne otopine ispitivane kemikalije u DMSO-u s dopunjenim medijem radi postizanja željene konačne koncentracije za svaku dozu te dodavanje smjese u svaku jažicu neposredno nakon uklanjanja starog medija. Ako se upotrebljava ova mogućnost, koncentracija u jažicama DMSO-a (0,1 %) trebala bi biti jednaka. Jažice s dvije najviše koncentracije vizualno se procjenjuju stereomikroskopom s obzirom na nastanak taloga ili oblaka kao pokazatelja nedovršenog otapanja ispitivane kemikalije. Ako se uoče takvi uvjeti (oblaci, nastanak taloga), pregledavaju se i jažice sa sljedećim nižim koncentracijama itd., a koncentracije koje nisu u potpunosti prešle u otopinu treba isključiti iz daljnje evaluacije i analize. Pločica se vraća u inkubator na 37 °C s 5 %-tnim CO_2 u zraku na 48 sati. Izgled pločice s ispitivanom kemikalijom naveden je u tablici 6. Zalihe 1. do 7. predstavljaju smještaj rastućih doza ispitivane kemikalije.

▼M5

Tablica 6.

Shema doziranja za izlaganje stanica H295R ispitivanim kemikalijama na pločici s 24 jažice

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4. zaliha	4. zaliha	4. zaliha
B	1. zaliha	1. zaliha	1. zaliha	5. zaliha	5. zaliha	5. zaliha
C	2. zaliha	2. zaliha	2. zaliha	6. zaliha	6. zaliha	6. zaliha
D	3. zaliha	3. zaliha	3. zaliha	7. zaliha	7. zaliha	7. zaliha

40. Nakon 48 sati pločice za izlaganje vade se iz inkubatora te se svaka jažica provjerava pod mikroskopom kako bi se utvrdilo stanje stanica (prianjanje, morfologija, stupanj konfluencije) i znakovi citotoksičnosti. Medij iz svake jažice dijeli se u dvije jednake količine (približno 490 µl svaka) i premješta u dvije zasebne, odgovarajuće označene posude (tj. jedan alikvot kao rezervni uzorak za svaku jažicu). Kako bi se spriječilo isušivanje stanica, medij se uklanja redak po redak ili stupac po stupac i zamjenjuje medijem za test vitalnosti stanica/citotoksičnost. Ako se vitalnost stanica/citotoksičnost ne mjeri odmah, u svaku se jažicu dodaje 200 µl fiziološke otopine s fosfatnim pulferom s Ca^{2+} i Mg^{2+}. Mediji se zamrzavaju pri – 80 °C do daljnje obrade radi analize koncentracija hormona (vidjeti stavke 44. do 46.) Iako su hormoni T i E2 koji se čuvaju u mediju pri – 80 °C u pravilu stabilni najmanje 3 mjeseca, stabilnost hormona tijekom čuvanja treba dokumentirati unutar svakog laboratorija.

41. Neposredno nakon uklanjanja medija vitalnost stanica/citotoksičnost utvrđuje se za svaku pločicu za izlaganje.

Utvrđivanje vitalnosti stanica

42. Radi utvrđivanja potencijalnog učinka ispitivane kemikalije na vitalnost stanica moguće je upotrijebiti test vitalnost stanica/citotoksičnosti po izboru. Testom bi se trebalo moći doći do podataka o pravoj vrijednosti postotka vitalnih stanica prisutnih u jažici ili treba dokazati da se on može izravno usporediti s (linearnom funkcijom) testa Live/Dead® (vidjeti Dodatak III. izvješću o validaciji (4)). Alternativni test za koji je dokazano da je jednako učinkovit test je MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol bromid] (18). Procjena vitalnosti stanica s pomoću prethodno navedenih metoda relativna je vrijednost kojom se nužno ne ukazuje na linearne odnose s apsolutnim brojem stanica u jažici. Zato bi analitičar istodobno trebao obaviti subjektivnu procjenu svake jažice i zabilježiti digitalne fotografije kontrole otapala i dvije najviše necitotoksične koncentracije i pohraniti ih za kasniju procjenu stvarne gustoće stanica prema potrebi. Ako se vizualnim pregledom utvrdi ili testom vitalnosti stanica/citotoksičnosti dokaže povećanje broja stanica, to povećanje treba potvrditi. Ako se povećanje broja stanica potvrdi, to treba navesti u izvješću o ispitivanju. Vitalnost stanica izrazit će se u odnosu na prosječnu reakciju u kontrolama otapala, što se smatra 100 % vitalnim stanicama te se izračunava prema potrebi za test vitalnost stanica/citotoksičnosti koji se upotrebljava. Za test MTT moguće je upotrijebiti sljedeću formulu:

▼M5

% vitalnih stanica = (reakcija u jažici – prosječna reakcija u jažicama tretiranima metanolom (= 100 % mrtve)) ÷ (prosječna reakcija u jažicama s kontrolom otapala – prosječna reakcija u jažicama tretiranima metanolom (= 100 % mrtve))

43. Stanice čija je vitalnost manja od 80 % u odnosu na prosječnu vitalnost u kontrolama otapala (= 100 % vitalnosti) ne treba uključiti u analizu konačnih podataka. Inhibiciju steroidogeneze koja se javlja u prisutnosti gotovo 20 % citotoksičnosti treba detaljno procijeniti kako bi se osiguralo da citotoksičnost nije uzrok inhibicije.

Analiza hormona

44. Svaki laboratorij za analizu hormona T i E2 može upotrebljavati sustav mjerenja hormona po izboru. Rezervne alikvote medija iz svake skupine za tretiranje moguće je upotrijebiti za pripremu otopina kako bi se koncentracija vratila unutar linearnog dijela standardne krivulje. Kako je navedeno u stavku 29., svaki bi laboratorij trebao dokazati sukladnost svojeg sustava mjerenja hormona (npr. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kriterijima za kontrolu kvalitete analizom dopunjenog medija kojem je dodana interna kontrola hormona prije provedbe kontrole kvalitete ili ispitivanja kemikalija. Kako bi se osiguralo da sastavni dijelovi ispitnog sustava ne utječu na mjerenje hormona, hormone treba ekstrahirati iz medija prije mjerenja (vidjeti stavak 30. za uvjete u kojima ekstrakcija jest ili nije potrebna). Preporučuje se da se ekstrakcija obavi nakon postupaka iz Dodatka III. izvješću o validaciji (4).

45. Ako se za mjerenje proizvodnje hormona upotrebljava komercijalni komplet za ispitivanje, analizu hormona treba provesti kako je navedeno u uputama koje osigurava proizvođač kompleta. Većina proizvođača ima jedinstveni postupak za analizu hormona. Otopine uzoraka treba prilagoditi tako da se očekivane koncentracije hormona za kontrole otapala nalaze unutar središta linearnog raspona standardne krivulje pojedinačnog testa (Dodatak III. izvješću o validaciji (4)). Vrijednosti izvan linearnog dijela standardne krivulje treba odbaciti.

46. Konačne koncentracije hormona izračunavaju se kako slijedi:

Primjer:

Ekstrahirano:	450 µl
Rekonstruirano u:	250 µl testnog pufera
Otopina u testu:	1:10 (kako bi se uzorak nalazio unutar linearnog raspona standardne krivulje)
Koncentracija hormona u testu:	150 pg/ml (već prilagođeno koncentraciji po ml testiranog uzorka)
Obnavljanje:	89 %
Konačna koncentracija hormona =	(Koncentracija hormona (po ml) ÷ obnavljanje) (faktor razrjeđivanja)
Konačna koncentracija hormona =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Odabir ispitnih koncentracija

47. Test treba provesti u dva neovisna pokusa. Osim ako su ranije informacije poput informacija o graničnim vrijednostima topljivosti ili citotoksičnosti osnova za odabir ispitnih koncentracija, preporučuje se da se ispitne koncentracije za početni pokus rasporede u intervalima log10, pri čemu je 10-3 M najviša koncentracija. Ako je kemikalija topljiva i nije citotoskična ni kod jedne ispitne koncentracije te ako je prvi pokus bio negativan na sve koncentracije, tada to treba potvrditi u jednom pokusu ili više njih u uvjetima jednakima prvom pokusu (tablica 7.). Ako su rezultati prvog pokusa dvosmisleni (tj. promjena omjera statistički je značajna iz kontrole otapala samo kod jedne koncentracije) ili pozitivni (tj. promjena omjera pri dvije susjedne koncentracije ili više njih statistički je značajna), ispitivanje treba ponoviti kako je navedeno u tablici 7. rafiniranjem odabranih ispitnih koncentracija. Ispitne koncentracije u drugom i trećem pokusu (prema potrebi) treba prilagoditi na temelju rezultata početnog pokusa kojima se izdvajaju koncentracije kojima je postignut učinak rasporedom koncentracije polovičnog logaritma (npr. ako je prvotni pokus od 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM uzrokovao indukcije pri 1 i 10 μM, koncentracije koje se ispituju u drugom pokusu trebale bi biti 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM)), osim ako su za postizanje LOEC-a potrebne niže koncentracije. U potonjem slučaju u drugom pokusu treba s pomoću skale polovičnog logaritma upotrijebiti najmanje pet koncentracija ispod najniže koncentracije ispitivane u prvom pokusu. Ako se prvi pokus ne potvrdi drugim (tj. statistički značaj ne pojavljuje se kod prethodno pozitivno ispitanoj koncentraciji ± 1 pomak koncentracije), treba provesti treći pokus u izvornim uvjetima ispitivanja. Dvosmisleni rezultati u prvom pokusu smatraju se negativnima ako uočeni učinak nije moguće potvrditi u bilo kojem od dvaju naknadnih pokusa. Dvosmisleni rezultati smatraju se pozitivnim reakcijama (pozitivnim učinkom) ako je reakciju moguće potvrditi u barem još jednom pokusu unutar pomaka koncentracije ± 1 (vidjeti odjeljak 55. za postupak tumačenja podataka).

Tablica 7.

Matrica odluke za moguće scenarije ishoda

1. pokus	2. pokus		3. pokus		Odluka	
Scenarij	Odluka	Scenarij	Odluka	Scenarij	Pozitivan	Negativan
Negativan	Potvrditi ([a])	Negativan	Zaustavljanje			X
Negativan	Potvrditi ([a])	Pozitivan	Rafinirati ([b])	Negativan		X
Dvosmislen ([c])	Rafinirati ([b])	Negativan	Potvrditi ([a])	Negativan		X
Dvosmislen ([c])	Rafinirati ([b])	Negativan	Potvrditi ([a])	Pozitivan	X	
Dvosmislen ([c])	Rafinirati ([b])	Pozitivan			X	
Pozitivan	Rafinirati ([b])	Negativan	Potvrditi ([a])	Pozitivan	X	

▼M5

1. pokus	2. pokus		3. pokus		Odluka	
Scenarij	Odluka	Scenarij	Odluka	Scenarij	Pozitivan	Negativan
Negativan	Potvrditi ([a])	Pozitivan	Rafinirati ([b])	Pozitivan	X	
Pozitivan	Rafinirati ([b])	Pozitivan	Zaustavljanje		X	

([a]) Potvrditi prethodni pokus jednakim dizajnom pokusa.
([b]) Ponoviti test pri rasporedu koncentracije polovičnog logaritma (izdvajanje koncentracije za koju je u prethodnom pokusu utvrđeno da je znatno drukčija.
([c]) Promjena omjera pri jednoj koncentraciji statistički je znatno različita od SC-a.

Kontrola kvalitete ispitne pločice

48. Osim sukladnosti s kriterijima pločice za kontrolu kvalitete, treba ispuniti i ostale kriterije u pogledu kvalitete navedene u tablici 8. koji se odnose na prihvatljivu varijaciju između ponovljenih jažica, ponovljene pokuse, linearnost i osjetljivost sustava mjerenja hormona, varijabilnost između ponovljenih vrijednosti hormona istog uzorka te postotak obnavljanja hormonskih dodataka nakon ekstrakcije medija (prema potrebi; vidjeti stavak 30. o zahtjevima u pogledu ekstrakcije). Podaci bi se trebali kretati unutar prihvatljivih raspona utvrđenih za svaki parametar da bi se razmatrali za daljnju evaluaciju. Ako ti kriteriji nisu ispunjeni, u tabelarni prikaz treba unijeti da za predmetni uzorak nisu ispunjeni kriteriji za kontrolu kvalitete te uzorak treba ponovno analizirati ili izostaviti iz podataka.

Tablica 8.

Prihvatljivi rasponi i/ili varijacije (%) za parametre pločica testa H295R.

LOQ: granica kvantifikacije sustava mjerenja hormona. CV: koeficijent varijacije; SC: kontrola otapala; DPM: dezintegracije po minuti

	Usporedba između	T	E2
Osnovna proizvodnja hormona u kontrolama otapala	Omjer veći od granice kvantifikacije	≥ 5-struko	≥ 2,5-struko
Pokusi izlaganja – unutar CV-a pločice za SC-ove (ponovljene jažice)	Apsolutne koncentracije	≤ 30 %	≤ 30 %
Pokusi izlaganja – između CV-a pločice za SC-ove (ponovljeni pokusi)	Promjena omjera	≤ 30 %	≤ 30 %
Sustav mjerenja hormona – osjetljivost	Vidljivo smanjenje omjera u odnosu na SC-ove	≥ 5-struko	≥ 2,5-struko
Sustav mjerenja hormona – CV ponovljenog mjerenja za SC-ove ([a])	Apsolutne koncentracije	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstrakcija medija – obnavljanje internog standarda 3H (prema potrebi)	DPM	≥ 65 % nominalno	

([a]) Odnosi se na ponovljena mjerenja istog uzorka.

▼M5

ANALIZA PODATAKA I IZVJEŠĆIVANJE

Analiza podataka

49. Radi evaluacije relativnog povećanja/smanjenja kemijski izmijenjene proizvodnje hormona rezultate treba svesti na srednju vrijednost kontrole otapala svake ispitne pločice te ih izraziti kao promjene u odnosu na kontrolu otapala u svakoj ispitnoj pločici. Sve podatke treba izraziti kao srednje ± 1 standardno odstupanje.

50. U analizu podataka treba uključiti samo podatke o hormonima iz jažica u kojima je citotoksičnost bila manja od 20 %. Relativne promjene treba računati kako slijedi:

Relativna promjena = (koncentracija hormona u svakoj jažici) ÷ (srednja koncentracija hormona u svim jažicama kontrole otapala).

51. Ako se vizualnim pregledom jažice utvrdi ili testom vitalnosti stanica/citotoksičnosti opisanim u stavku 42. dokaže povećanje broja stanica, to povećanje treba potvrditi. Ako se povećanje broja stanica potvrdi, to treba navesti u izvješću o ispitivanju.

52. Pretpostavke o normalnosti i homogenosti varijanci treba procijeniti prije provođenja statističkih analiza. Normalnost treba procijeniti s pomoću ploha standardne vjerojatnosti ili druge odgovarajuće statističke metode (npr. Shapiro-Wilkov test). Ako podaci (promjene omjera) nisu normalno distribuirani, treba pokušati transformaciju podataka radi približavanja normalnoj distribuciji. Ako su podaci normalno distribuirani ili blizu normalnoj distribuciji, razlike između skupina koncentracije kemikalije i kontrola otapala treba analizirati s pomoću parametrijskog testa (npr. Dunnettov test) pri čemu je koncentracija neovisna, a reakcija (promjena omjera) ovisna varijabla. Ako podaci nisu normalno distribuirani, treba upotrijebiti neparametarski test (npr. Kruskal-Wallisov test, Steelov Many-one rank test). Razlike se smatraju bitnima pri $p \leq 0,05$. Statističke procjene daju se na temelju prosječnih vrijednosti za svaku jažicu koja predstavlja neovisne ponovljene točke podataka. Očekuje se da zbog velikog razmaka između doza u prvom pokusu (skala log10) u brojnim slučajevima neće biti moguće opisati jasne odnose između koncentracije i doze kad se dvije najviše doze nalaze na linearnom dijelu sigmoidne krivulje. Zato će se za prvi pokus i sve ostale komplete podataka u takvom slučaju (npr. kad nije moguće procijeniti maksimalnu efikasnost) primijeniti gore opisana statistika fiksne varijable vrste I.

53. Ako se više od dvije točke podataka nalaze na linearnom dijelu krivulje i ako se maksimalne efikasnosti mogu izračunati, kao što se predviđa za neke od drugih sljedova koji se provode prema polulogaritamskom razmaku koncentracija izlaganja, za izračun efikasnih koncentracija (npr. EC50 i EC20) treba upotrebljavati probit, logit ili drugi odgovarajući model regresije.

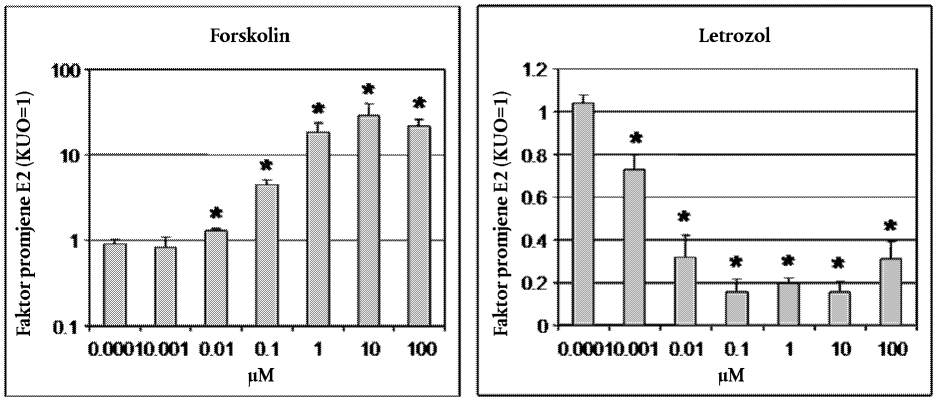
54. Rezultate treba navesti u grafičkom (grafikoni sa stupcima koji predstavljaju standardno odstupanje ± 1) i tabličnom (LOEC/NOEC, smjer učinka i jačina najveće reakcije koja je dio podataka o dozi-reakciji) obliku (vidjeti sliku 3. za primjer). Procjena podataka smatra se valjanom samo ako se temeljila na najmanje dvama neovisno provedenim pokusima. Pokus ili neovisni pokus smatra se neovisnim ako je proveden drugog datuma i upotrebom novog kompleta otopina i kontrola. Raspon koncentracija u drugom i trećem pokusu moguće je prilagoditi na temelju rezultata iz prvog pokusa radi boljeg definiranja raspona doza reakcija koji sadržava LOEC (vidjeti stavak 47.).

▼M5

Slika 3.

Primjer prezentacije i evaluacije podataka dobivenih tijekom provođenja testa H295R u grafičkom i tabličnom obliku.

(Zvjezdice se odnose na statistički značajne razlike od kontrole otapala ($p < 0,05$). LOEC: najniža koncentracija s vidljivim učinkom; najveća promjena: najveća jačina uočene reakcije pri bilo kojoj koncentraciji u odnosu na prosječnu reakciju kontrole otapala (= 1).)



Kemikalija	LOEC	Najveća promjena
Forskolin	0,01	0,15-struko
Letrozol	0,001	29-struko

Postupak za tumačenje podataka

55. Ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom ako je indukcija omjera statistički različita ($p \leq 0,05$) od kontrole otapala pri dvije susjedne koncentracije u najmanje dvama neovisnim pokusima (tablica 7.). Ispitivana kemikalija smatra se negativnom nakon dvaju neovisnih negativnih pokusa ili ako su od tri pokusa dva negativna i jedan dvosmislen ili pozitivan. Ako podaci dobiveni trima neovisnim pokusima nisu u skladu s kriterijima za odlučivanje iz tablice 7., rezultati pokusa ne mogu se tumačiti. Rezultate pri koncentracijama koje premašuju granice topljivosti ili pri citotoksičnim koncentracijama ne treba uključiti u tumačenje rezultata.

Izvješće o ispitivanju

56. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje

— naziv i lokacija ustanove,

— voditelj studije i ostalo osoblje i njihovi zadaci,

— datumi početka i završetka studije.

▼**M5**

Ispitivana kemikalija, reagensi i kontrole

— identitet (naziv/br. CAS prema potrebi), podrijetlo, broj lota/serije, čistoća, dobavljač i karakterizacija ispitivane kemikalije, reagensa i kontrola,

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije,

— uvjeti skladištenja i metoda i učestalost pripreme ispitivanih kemikalija, reagensa i kontrola,

— stabilnost ispitivane kemikalije.

Stanice

— podrijetlo i vrsta stanica,

— broj prolaza (identifikator prolaza stanica) stanica upotrijebljenih u ispitivanju,

— opis postupaka za održavanje staničnih kultura.

Zahtjevi prije ispitivanja (prema potrebi)

— opis i rezultati ispitivanja interferencije metodom kemijskih hormona

— opis i rezultati mjerenja efikasnosti ekstrakcije hormona,

— standardne i kalibracijske krivulje za sve analitičke testove koje treba provesti,

— granice otkrivanja za odabrane analitičke testove.

Ispitni uvjeti

— sastav medija,

— koncentracija ispitivane tvari,

— gustoća stanica (procijenjene ili izmjerene koncentracije stanica nakon 24 sata i 48 sati)

— topljivost ispitivane kemikalije (granica topljivosti, ako je utvrđena),

— vrijeme i uvjeti inkubacije.

Rezultati ispitivanja

— sirovi podaci za svaku jažicu za kontrole i ispitivane kemikalije – svaka ponovljena vrijednost u obliku izvornih podataka instrumenta upotrijebljenog za mjerenje proizvodnje hormona (npr. OD, jedinice fluorescencije, DPM itd.),

— validacija normalnosti ili objašnjenje transformacije podataka,

— srednje reakcije standardnog odstupanja ± 1 za svaku izmjerenu jažicu,

— podaci o citotoksičnosti (ispitne koncentracije koje su uzrokovale citotoksičnost),

— potvrda sukladnost sa zahtjevima za kontrolu kvalitete,

▼M5

— relativna promjena u usporedbi s kontrolom otapala ispravljenom zbog citotoksičnosti,

— grafikon sa stupcima kojim se prikazuje relativni (promjena omjera) značaj pri svakoj koncentraciji i statistički značaj kako je navedeno u stavcima 49. do 54.

Tumačenje podataka

— primijeni postupak za tumačenje podataka na rezultate i provedi raspravu o nalazima.

Rasprava

— postoje li ikakve naznake iz studije o mogućnosti da na podatke o hormonima T/E2 mogu utjecati neizravni učinci na putove glukokortikoida i mineralnih kortikoida?

Zaključci

LITERATURA

(1) OECD (2002.), OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija, Dodatak 2. poglavlju B.54. ovog Priloga.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006.), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, Toxicol. Appl. Pharmacol., 217, 114. – 124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007.), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. Env. Sci. Pollut. Res., 14., 23. – 30.

(4) OECD (2010.), Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Pariz. Dostupno na [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html].

(5) OECD (2010.), Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html].

(6) Battelle (2005.), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, dostupno na: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004.), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, Toxicol. Sci., 81., 78. – 89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002.), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, Toxicol. Appl. Pharmacol., 182., 44. – 54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010.), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, Environ. Health Perspect., 118.: 265. – 272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010.), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, Environ. Sci. Poll. Res., 17:1137. – 1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990.), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, Cancer Res., 50., 5488. – 5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010.), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, Chemosphere, 80:578. – 584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005.), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, Environ. Sci. Technol., 39:2777. – 2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010.), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, Environ. Sci. Pol. Res., 17:1137. – 1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993.), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77., 731. – 737.

(16) Poglavlje B55. ovog Priloga: Hershbergerov biotest na glodavcima: Kratkoročni test probira na (anti)androgenska obilježja.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976.), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, J. Lab. Clin. Med., 2., 222. – 231.

(18) Mosmann, T. (1983.), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods., 65., 55. – 63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999.). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598. – 1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006.), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484– 492.

▼M5

Dodatak

DEFINICIJE:

Konfluentnost se odnosi na pokrivenost ili širenje stanica preko medija kulture ili kroz njega.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

CV (coefficient of variation) se odnosi na koeficijent varijacije te se definira kao omjer standardnog odstupanja distribucije od njezine aritmetičke sredine.

CYP je kratica za citokrom P450 monooksigenazu, obitelj gena i od njih proizvedenih enzima koji sudjeluju u katalizaciji brojnih različitih biokemijskih reakcija, uključujući sintezu i metabolizam steroidnih hormona.

DPM je dezintegracija po minuti. To je broj atoma u određenoj količini radioaktivnog materijala koji se dezintegriraju u jednoj minuti.

E2 je 17β-estradiol, najvažniji estrogen u sustavima sisavaca.

Stanice **H295R** stanice su humanog adrenokarcinoma koje se odlikuju fiziološkim karakteristikama zonalno nediferenciranih humanih fetalnih adrenalnih stanica i koje izražavaju sve enzime puta steroidogeneze. One se mogu nabaviti od ATCC-a.

Medij za zamrzavanje upotrebljava se za zamrzavanje i čuvanje smrznutih stanica. On se sastoji od radnog medija s dodatkom nuseruma BD i dimetil sulfoksida.

Linearni raspon je raspon unutar standardne krivulje za sustav mjerenja hormona u kojem su rezultati proporcionalni koncentraciji analita koji se nalazi u uzorku.

LOQ (limit of quantification) kratica je za granicu kvantifikacije i odnosi se na najnižu količinu kemikalije koju je moguće razlikovati od izostanke te kemikalije (prazna vrijednost) unutar navedene granice pouzdanosti. Za potrebe ove metode granicu kvantifikacije u pravilu definira proizvođač sustava ispitivanja, ako nije drukčije određeno.

LOEC (lowest observed effect concentration) je najniža koncentracija s vidljivim učinkom, odnosno najniža koncentracija pri kojoj je testna reakcija statistički različita od reakcije kontrole otapala.

NOEC (no observed effect concentration) najviša je koncentracija bez vidljivog učinka, odnosno najviša koncentracija koja se ispituje ako se testom ne izazove pozitivna reakcija.

Prolaz je broj kojim se označava količina dijeljenja stanica nakon započinjanja kulture iz zamrznute zalihe. Prvom prolazu koji je započet iz zamrznute zalihe dodjeljuje se broj jedan (1). Stanice koje su se podijelile jednom označavaju se oznakom prolaz 2 itd.

PBS je Dulbeccova fiziološka otopina s fosfatnim pulferom.

Kontrola kvalitete odnosi se na vrijednosti nužne za osiguranje valjanih podataka.

Pločica za kontrolu kvalitete jest pločica s 24 jažice i dvije koncentracije pozitivnih i negativnih kontrola za praćenje učinka nove serije stanica ili za osiguranje pozitivnih kontrola za test pri ispitivanju kemikalija.

Pokus je neovisni pokus koji karakterizira novi komplet otopina i kontrola.

Osnovni medij jest osnova za pripremu ostalih reagensa. On se sastoji od smjese 1:1 Dulbeccova modificiranog Eagleova medija i Hamove F-12 hranjive mješavine (DMEM/F12) u 15 mM HEPES pufera bez fenol crvene ili natrijeva bikarbonata. Natrijev bikarbonat dodaje se kao pufer, vidjeti Dodatak II. izvješću o validaciji (4).

▼M5

Dopunjeni medij sastoji se od radnog medija s dodatkom nuseruma BD i ITS+ premium mješavine, vidjeti Dodatak II. izvješću o validaciji (4).

Steroidogeneza je put sinteze koji vodi od kolesterola do raznih steroidnih hormona. Nekoliko hormona posrednika na putu sinteze steroida, poput progesterona i testosterona, važni su hormoni sami po sebi, ali služe i kao prekursori hormonima u nastavku puta sinteze.

T se odnosi na testosteron, jedan od dvaju najvažnijih androgena u sustavima sisavaca.

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

Ispitna pločica jest pločica na kojoj se stanice H295R izlažu ispitivanoj kemikaliji. Ona sadržava kontrolu otapala i ispitivana kemikalija pri sedam razina koncentracija u tri primjerka.

Tripsin 1X razrijeđena je otopina enzima tripsina, serin proteaze gušterače, koji se upotrebljava za skidanje stanica s pločice za kultivaciju stanica, vidjeti Dodatak III. izvješću o validaciji (4).

▼M5

B.58. **TRANSGENSKE ANALIZE MUTACIJE GENA SOMATSKIH I SPOLNIH STANICA GLODAVACA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda istovjetna je Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 488 (2013.). Ispitne metode EU-a dostupe su za široki raspon in vitro analiza mutacije kojima se mogu otkriti kromosomske i/ili genske mutacije. Postoje ispitne metode za in vivo granične vrijednosti (tj. kromosomske aberacije i neplanirane sinteze DNK-a); međutim, njima se ne mogu mjeriti genske mutacije. Transgenske analize mutacije u glodavaca zadovoljavaju potrebu za praktičnima i široko dostupnima in vivo ispitivanjima mutacija gena.

2. Transgenske analize mutacije u glodavaca temeljito su analizirane (24) (33). Obuhvaćaju transgenske štakore i miševe koji imaju više primjeraka kromosomski integriranih prijenosnih vektora plazmida ili faga. Transgeni sadržavaju gene koji daju informacije potrebne za utvrđivanje različitih vrsta mutacija izazvanih in vivo ispitnim kemikalijama.

3. Mutacije koje se pojave u glodavca bilježe se regeneriranjem transgena i analizom fenotipa gena koji daje informaciju u bakterijskom domaćinu kojem nedostaje gen koji daje informaciju. Transgenskim analizama mutacije gena u glodavaca mjere se mutacije izazvane u genetski neutralnim genima regeneriranima iz gotovo bilo kojeg tkiva glodavca. Tim se analizama stoga izbjegava mnogo postojećih ograničenja koja se vezuju uz istraživanje in vivo genetskih mutacija endogenih gena (tj. ograničena količina tkiva pogodnog za analizu, negativna/pozitivna selekcija prema mutacijama).

4. Dokazna snaga ukazuje na to da transgeni reagiraju na mutagene na sličan način kao endogeni geni, posebno u pogledu otkrivanja supstitucija, pomaka okvira mutacija i manjih brisanja i unošenja baznih parova (24).

5. Međunarodnim radionicama o ispitivanju genotoksičnosti (IWGT) podržalo se uključivanje transgenskih analiza mutacije gena za in vivo otkrivanje genskih mutacija i preporučuje se protokol za njihovu primjenu (15) (29). Ova se ispitna metoda temelji na tim preporukama. Daljnja analiza na osnovu koje se podržava korištenje ovog protokola može se pronaći u (16).

6. Očekuje se da će u budućnosti biti moguće spojiti transgensku analizu mutacije gena s istraživanjem toksičnosti nakon ponovljene doze (poglavlje B.7. ovog Priloga). Međutim, potrebni su podaci da bi se osiguralo da na osjetljivost transgenske analize mutacije gena ne utječe kraće razdoblje od jednog dana između kraja razdoblja primjene i razdoblja uzimanja uzoraka, kako se upotrebljava u istraživanju o toksikologiji ponavljanih doza, u usporedbi s tri dana koji se upotrebljavaju u transgenskim analizama mutacije gena. Potrebni su i podaci koji dokazuju da na rezultate analize ponavljanih doza negativno ne utječe korištenje transgenskih sojeva glodavaca umjesto tradicionalnih sojeva glodavaca. Kada su ti podaci dostupni, ova se ispitna metoda ažurira.

7. Definicije ključnih pojmova nalaze se u Dodatku.

▼M5

UVODNA RAZMATRANJA

8. Transgenske analize mutacija gena u glodavaca za koje su dostupni odgovarajući podaci koji potkrepljuju njihovu upotrebu u ovoj ispitnoj metodi su: lacZ bakteriofag miša (MutaäMouse); lacZ plazmid miša; gpt delta (gpt i Spi –) miša i štakora; lacI miša i štakora (Big Blue®), kako se provode u standardnim uvjetima. K tome, cII analiza pozitivne selekcije može se upotrebljavati za procjenu mutacija u modelima za miševe Big Blue® i Muta™Mouse. Mutagenost u transgenskim analizama mutacije gena u glodavaca obično se procjenjuje kao učestalost mutacije; međutim, ako je potrebno, molekularnom analizom mutacija mogu se pribaviti dodatni podaci (vidjeti stavak 24.).

9. Ovakva in vivo ispitivanja genskih mutacija na glodavcima posebno su relevantna za ocjenjivanje opasnosti od pojave mutagenosti zato što omogućuju sagledavanje faktora in vivo metabolizma, farmakokinetku i procese popravka DNK-a i translezijske sinteze DNK-a, iako oni mogu varirati kod različitih životinjskih vrsta, različitih tkiva, kao i kod različitih vrsta oštećenja DNK-a. Analiza in vivo isto je tako korisna za daljnja istraživanja mutagenih učinaka otkrivenih s pomoću određenog sustava in vitro, i za praćenje rezultata ispitivanja s pomoću drugih in vivo graničnih vrijednosti. Osim toga što se neobvezno povezuje s pojavom raka, mutacija gena bitna je krajnja točka za predviđanje nekancerogenih bolesti temeljenih na mutacijama u somatskim tkivima (12) (13), kao i bolesti koje se prenose zametnom lozom.

10. Ako postoje dokazi da ispitivana tvar ili odgovarajući metabolit neće stići ni do jednog ciljnog tkiva, nije primjereno primjenjivati transgenske analize mutacije gena u glodavaca.

NAČELO ISPITNE METODE

11. U analizama opisanima u stavku 8. ciljni je gen bakterijskog ili bakteriofagnog podrijetla, a regeneracija iz genomskog DNK-a glodavca postiže se ugrađivanjem transgena u λ bakteriofagni ili plazmidni prijenosni vektor. Postupak uključuje ekstrakciju genomskog DNK-a iz ciljnog tkiva glodavca, in vitro obradu genomskog DNK-a (tj. pakiranje λ vektora, ili ligaciju i elektroporaciju plazmida za regeneraciju prijenosnog vektora), i naknadno utvrđivanje mutacija u bakterijskim domaćinima u odgovarajućim uvjetima. U analizama se upotrebljavaju neutralni transgeni koji se mogu brzo regenerirati iz većine tkiva.

12. Osnovni pokus transgenske analize mutacije gena u glodavaca uključuje tretiranje glodavca određenom kemikalijom tijekom određenog vremenskog razdoblja. Kemikalije se mogu primjenjivati odgovarajuće, uključujući implantaciju (tj. ispitivanje medicinskim napravama). Ukupno razdoblje tijekom kojeg se doza primjenjuje na životinju naziva se razdobljem primjene. Nakon razdoblja primjene slijedi vremensko razdoblje, prije žrtvovanja, tijekom kojeg se kemikalija ne primjenjuje i tijekom kojeg se nepopravljene lezije DNK-a pričvršćuju na stabilne mutacije. U literaturi se to razdoblje različito naziva kao razdoblje tijekom kojeg dolazi do manifestacija, razdoblje fiksiranja ili razdoblje izražavanja; kraj tog razdoblja vrijeme je uzimanja uzoraka (15) (29). Nakon žrtvovanja životinje genomski se DNK izolira iz određenog predmetnog tkiva (ili više tkiva) te pročišćava.

▼M5

13. Podaci u vezi s jednom određenom vrstom životinje iz različitih pakiranja/ligacija obično se agregiraju i učestalost mutacije općenito se procjenjuje upotrebom ukupnog broja između 10^5 i 10^7 jedinica koje stvaraju plakove ili jedinica koje stvaraju koloniju. Kod upotrebe pozitivnih metoda selekcije ukupni broj jedinica koje stvaraju plakove utvrđuje se s pomoću odvojenih neselektivnih ploča.

14. Metode pozitivne selekcije razvijene su za olakšavanje otkrivanja mutacija u genu gpt (delta gpt miša i štakora, fenotip gpt– (20) (22) (28)) i gena lacZ (Muta™Mouse ili lacZ kod plazmidnog miša (3) (10) (11) (30)); dok se mutacije gena lacI u životinjama Big Blue® otkrivaju neselektivnom metodom kojom se utvrđuju mutanti stvaranjem obojenih (plavih) plakova. Metodologija pozitivne selekcije primjenjuje se i da bi se otkrile točkaste mutacije koje nastaju u genu cII u λ bakteriofagnom prijenosnom vektoru (Big Blue® miš ili štakor i Muta™Mouse (17)) i brisanje mutacija u λ crvenim i gama genima (Spi – selekcija u gpt delta mišu i štakoru (21) (22) (28)). Učestalost mutacije izračunava se diobom broja plakova/plazmida koji sadržavaju mutacije u transgenu, ukupnim brojem plakova/plazmida regeneriranih iz istog uzorka DNK-a. Kod istraživanja transgenskih analiza mutacija gena u glodavaca učestalost mutacije jest parametar izvješćivanja. K tome, učestalost mutacije može se odrediti kao udio stanica koje nose neovisne mutacije; ovaj izračun zahtijeva korekcije u vezi s klonalnim širenjem, sekvenciranjem regeneriranih mutanata (24).

15. Mutacije zabilježene u analizama točkastih mutacija lacI, lacZ, cII i gpt sastoje se primarno od zamijenjenih mutacija baznih parova, pomaka okvira mutacija i manjih unošenja/brisanja. Relativni omjer tih vrsta mutacija kod spontanih mutacija sličan je onome koji je utvrđen kod endogenog gena Hprt. Velika brisanja utvrđena su samo kod selekcije Spi – i analiza plazmida lacZ (24). Mutacije koje su zanimljive in vivo su mutacije koje se pojavljuju u miša i štakora. In vitro i ex vivo mutacije koje se mogu pojaviti tijekom regeneriranja faga/plazmida, repliciranja ili popravka, razmjerno su rijetke i mogu se posebno identificirati u nekim sustavima ili izuzeti pozitivnim selekcijskim sustavom bakterijskog domaćina.

OPIS METODE

Priprema

Odabir životinjskih vrsta

16. Trenutačno je dostupno više modela utvrđivanja transgenskih mutacija gena miša i ti su sustavi upotrijebljeni puno više od transgenskih modela za štakore. Ako je štakor očigledno primjereniji model od miša (tj. kod istraživanja mehanizama kancerogeneze tumora primijećenog isključivo u štakora, za usporedbu s istraživanjem toksičnosti štakora ili za slučajeve kada je metabolizam štakora dokazano usporediviji s ljudskim metabolizmom) treba razmotriti upotrebu transgenskih modela štakora.

Uvjeti smještaja i hranjenja

17. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje trebala bi biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50 – 60 %. Svjetlost bi trebala biti umjetna, s tim da je redoslijed 12 sati svjetla, 12 sati tame. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana s neograničenom količinom vode za piće. Na

▼M5

izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije ako se ona daje u hrani. Životinje treba držati u manjim skupinama (ne više od pet jedinki) istog spola ako se ne očekuje agresivno ponašanje. Ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama.

Priprema životinja

18. Zdrave mlade seksualno zrele odrasle životinje (starosti 8 – 12 tjedana na početku tretmana) biraju se nasumce i raspodjeljuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Životinje se označuju jedinstvenim oznakama. Životinje se najmanje pet dana prilagođavaju laboratorijskim uvjetima. Kaveze treba urediti tako da se eventualni učinci držanja u kavezu svedu na minimum. Na početku studije variranje tjelesne mase životinja treba biti što manje i ne smije prelaziti ± 20 % od odgovarajuće srednje vrijednosti mase svakog spola.

Priprema doza

19. Prije no što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima i razrijediti. Tekuće ispitivane tvari mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, kemikalije koje se upotrebljavaju kod ispitivanja mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizičko-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo, pripravke ispitivane tvari treba koristiti svježe.

Uvjeti ispitivanja

Otapalo/nosač

20. Pri visinama doza koje se upotrebljavaju, otapalo/nosač ne smije imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanim tvarima. Ako se upotrebljavaju otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje treba potkrijepiti referentnim podacima koji pokazuju njihovu sukladnost. Kad god je to moguće preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača.

Pozitivna kontrola

21. Obično treba upotrebljavati paralelne pozitivne kontrolne životinje. Međutim, za laboratorije koji su dokazali tu sposobnost (vidjeti stavak 23.) i rutinski koriste te analize, DNK-ovi iz prethodnih pozitivnih kontrola tretiranih životinja mogu se uključiti sa svakim istraživanjem da bi se potvrdila uspješnost metode. Takav DNK iz prethodnih eksperimenata trebao bi se dobiti iz iste predmetne vrste i tkiva te bi se trebala primjereno pohraniti (vidjeti stavak 36.). Kod primjene paralelnih pozitivnih kontrola nije neophodno primjenjivati ih istim putem kao i kemikaliju koja se upotrebljava za ispitivanje; međutim, pozitivne kontrole trebale bi sa sigurnošću poticati mutacije u jednoj ili više vrsta tkiva na koje se odnosi ta kemikalija. Doze kemikalija pozitivne kontrole trebale bi se odabrati tako da proizvode slabe ili umjerene učinke kojima se kritički procjenjuju rezultati i osjetljivost analize. Primjeri kemikalija pozitivne kontrole i nekih njihovih ciljnih tkiva uključeni su u tablici 1.

▼M5

Tablica 1.

Primjeri kemikalija pozitivne kontrole i nekih njihovih ciljnih tkiva

Kemikalije pozitivne kontrole i br. CAS	EINECS naziv i EINECS br.	Karakteristike	Ciljno tkivo mutacije	
			Štakor	Miš
N-etil-N-nitrozourea (CAS br. 759-73-9)	N-etil-N-nitrozourea (212 -072 -2)	Spoj direktnog djelovanja	Jetra, pluća	Koštana srž, debelo crijevo, crijevni epitel, crijeva, jetra, pluća, slezena, bubreg, jajne granulozne stanice, zametne stanice mužjaka
etil-karbamat (uretan) (CAS br. 51-79-6)	Uretan (200 -123 -1)	Mutagen, treba metabolizam, no proizvodi samo slabe učinke		Koštana srž, potrbušnica, tanko crijevo, jetra, pluća, slezena
2,4 Diaminotoluen (CAS br. 95-80-7)	4-metil-m-fenilen-diamin (202 -453 -1)	Mutagen, treba metabolizam, isto tako pozitivan u analizi Spi-	Jetra	Jetra
Benzo[e]piren (CAS br. 50-32-8)	benzo[def]krizen (200 -028 -5)	Mutagen, treba metabolizam	Jetra, trbušna maramica,	Koštana srž, dojka, debelo crijevo, potrbušnica, žljezdani želudac, srce, jetra, pluća, zametne stanice mužjaka

Negativne kontrole

22. Negativne kontrole, koje se tretiraju samo otapalom ili nosačem i koje su osim toga tretirane na jednak način kao i skupine koje se tretiraju, trebale bi biti uključene u svako uzorkovanje. U nedostatku povijesnih ili objavljenih kontrolnih podataka kojima se dokazuje da odabrano otapalo ili nosač nema štetne i mutagenske učinke, netretirane kontrolne skupine isto bi tako trebale biti uključene u svakom uzimanju uzoraka da bi se utvrdila prihvatljivost kontrole nosača.

Provjera osposobljenosti laboratorija

23. Sposobnost primjene ovih analiza trebala bi se utvrditi dokazivanjem sposobnosti stvaranja očekivanih rezultata na temelju objavljenih podataka (24) za: 1) učestalosti pojave mutanata s kemikalijama pozitivne kontrole (uključujući one sa slabim učincima) kao što su one navedene u tablici 1., ne-mutagenima, i kontrolama nosača; i 2) regeneriranjem transgena iz genomskog DNK-a (tj. učinkovitost pakiranja).

Sekvenciranje mutanata

24. Za regulatorne primjene sekvenciranje DNK-a mutanata nije neophodno, osobito kada se dobije jasan pozitivan ili negativan rezultat. Međutim, podaci o sekvenciranju mogu biti korisni kada se primijete velike varijacije između pojedinih jedinki. U tim se slučajevima sekvenciranje može upotrebljavati da bi se isključila mogućnost jackpota ili klonalnih manifestacija, identifikacijom omjera jedinstvenih mutanata iz određenog tkiva. Sekvenciranje otprilike 10 mutanata po tkivu po životinji trebalo bi biti dostatno za jednostavno utvrđivanje doprinose li klonalni mutanti

▼M5

učestalosti mutanata; moguće je potrebno sekvenciranje i do 25 mutanata da bi se matematički ispravila učestalost mutanta u pogledu klonaliteta. Sekvenciranje mutanata može se razmatrati i kada se utvrde mala povećanja učestalosti mutanata (tj. povećanja koja prelaze neobrađene kontrolne vrijednosti). Razlike u spektru mutanta između kolonija mutanata u pogledu tretiranih i netretiranih životinja može potaknuti mutagenski učinak (29). Isto tako, spektri mutacija mogu biti korisni za razvoj pretpostavki o mehanizmima. Kada se sekvenciranje uključuje kao dio protokola istraživanja, treba pridati posebnu pažnju osmišljavanju takvih istraživanja, posebno s obzirom na broj mutanata sekvenciranih po uzorku, da bi se ostvarila odgovarajuća pouzdanost u skladu s korištenim statističkim modelom (vidjeti stavak 43.).

POSTUPAK

Broj i spol životinja

25. Broj životinja po skupini trebao bi se odrediti unaprijed, da bi se na odgovarajući način osigurala statistička valjanost neophodna za utvrđivanje barem dvostruke učestalosti mutanata. Skupine se prema veličini sastoje od najmanje pet životinja; međutim, ako je statistička valjanost nedovoljna, broj životinja trebao bi se prema potrebi povećati. Obično bi se trebali upotrebljavati mužjaci životinja. Može biti slučajeva kada je opravdano ispitivanje i samo na ženkama; na primjer kod ispitivanja lijekova specifičnih za žene ili kod istraživanja ženskog metabolizma. Ako postoje značajne razlike između spolova u pogledu toksičnosti ili metabolizma, tada su potrebni i mužjaci i ženke.

Razdoblje primjene

26. Na temelju opažanja prema kojima se mutacije akumuliraju sa svakim tretmanom, potreban je režim ponovljenih doza, uz dnevne tretmane tijekom 28 dana. Takva se primjena smatra prihvatljivom za stvaranje odgovarajuće akumulacije mutacije slabih mutagena i za osiguravanje odgovarajućeg razdoblja izloženosti primjerenog za utvrđivanje mutacija u organima koji se sporo razmnožavaju. Alternativni postupci tretiranja mogu biti odgovarajući za neke procjene i ti alternativni rasporedi doziranja trebali bi biti znanstveno opravdani u protokolu. Tretmani ne bi trebali biti kraći od vremenskog razdoblja koje je potrebno za potpuno uvođenje svih odgovarajućih enzimskih sustava koji sudjeluju u metabolizmu i kraći bi tretmani mogli zahtijevati upotrebu većeg broja uzimanja uzoraka što je odgovarajuće za organe s različitim stopama razmnožavanja. U svakom slučaju, svi dostupni podaci (tj. o općenitoj toksičnosti ili metabolizmu i farmakokinetici) trebali bi se koristiti kod opravdavanja protokola, posebno kada je prisutno odstupanje od prethodno navedenih standardnih preporuka. Iako mogu povećati osjetljivost, razdoblja tretiranja dulja od 8 tjedana treba dodatno pojasniti i opravdati jer dugačka razdoblja tretiranja mogu proizvesti očito povećanje učestalosti mutanata klonalnim širenjem (29).

Visine doza

27. Visine doza trebale bi se temeljiti na rezultatima istraživanja o utvrđivanju raspona doze kojom se mjeri opća toksičnost koja je provedena istim načinom izlaganja ili na rezultatima istraživanja već prisutne subakutne toksičnosti. Za određivanje raspona doza mogu se upotrebljavati ne-transgenske životinje istog soja glodavaca. U glavnom ispitivanju, da bi se dobili podaci o odgovoru na dozu, cjelokupno istraživanje trebalo bi obuhvatiti negativnu kontrolnu skupinu (vidjeti stavak 22.) i najmanje tri odgovarajuće

▼M5

raspoređene razine doza, osim kada se upotrebljava granična razina doze (vidjeti stavak 28.). Najviša doza trebala bi biti maksimalna tolerirana doza (MTD). MTD se definira kao doza koja uzrokuje takve znakove toksičnosti da je za očekivati da bi više doze pri istom režimu doziranja prouzročile smrt. Kemikalije s posebnim biološkim aktivnostima u ne-toksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja. Te bi doze trebale obuhvatiti raspon od maksimalne do male ili nikakve toksičnosti.

Granično ispitivanje

28. Ako eksperimenti s ciljem određivanja raspona doze ili postojeći podaci iz vezanih sojeva glodavaca pokazuju da tretman barem graničnom dozom (vidjeti tekst u nastavku) ne uzrokuje primjetljive toksične učinke i ako se na temelju podataka o strukturno srodnim kemikalijama ne očekuje genotoksičnost, potpuna studija uz primjenu tri razine doza ne smatra se potrebnom. Za razdoblje primjene od 28 dana (tj. 28 dnevnih primjena) granična doza je 1 000 mg/kg tjelesne mase/dnevno. Za razdoblja primjene od 14 dana ili manje, granična doza je 2 000 mg/kg tjelesne mase/dnevno (rasporedi doziranja koji se razlikuju od 28 dnevnih tretmana trebali bi se znanstveno opravdati u protokolu; vidjeti stavak 26.).

Primjena doza

29. Ispitivana se tvar obično primjenjuje unošenjem s pomoću želučane sonde ili odgovarajuće intubacijske kanile. Općenito, očekivani put ljudske izloženosti trebao bi se uzeti u obzir kod osmišljavanja analiza. Stoga drugi putovi izlaganja (kao što su pitka voda, potkožno, intravenozno, lokalno, inhalacije, primjenom u dušnik, unosom hrane ili implantacijom) mogu biti prihvatljivi kada se mogu opravdati. Intraperitonealna injekcija se ne preporučuje jer nije fiziološki odgovarajući put ljudske izloženosti. Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti sondom ili injekcijom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne smije prijeći 2 ml/100 g tjelesne mase. Opravdanost primjene većih volumena od navedenog treba dokazati. Osim kod nadražujućih i nagrizajućih tvari, za koje je normalno da u većim koncentracijama izazivaju intenzivnije učinke, variranje ispitnih volumena treba podešavanjem koncentracije svesti na minimum kako bi se kod svih visina doze osigurao stalni volumen.

Vrijeme uzorkovanja

Somatske stanice

30. Vrijeme uzimanja uzoraka kritična je varijabla jer je određuje razdoblje potrebno za postojanost mutacija. To razdoblje ovisi o pojedinom tkivu i čini se da je vezano uz vrijeme obrta stanične populacije, pri čemu koštana srž i crijeva najbrže odgovaraju, a jetra je puno sporija. Odgovarajući kompromis za mjerenje učestalosti mutacija kod tkiva koja se razmnožavaju sporo, odnosno brzo, 28 je uzastopnih dnevnih tretmana (kako je navedeno u stavku 26.) i uzorkovanje tri dana nakon konačnog tretmana, iako se maksimalna učestalost mutacije može ne pokazati kod tkiva koja se sporo razmnožavaju u tim uvjetima. Kada su tkiva koja se sporo razmnožavaju od posebne važnosti, tada bi moglo biti primjerenije kasnije razdoblje uzimanja uzoraka od 28 dana nakon razdoblja primjene od 28 dana (16) (29). U takvim slučajevima, kasnije vrijeme uzorkovanja zamjenjuje trodnevno razdoblje uzimanja uzoraka i zahtijeva znanstveno opravdanje.

▼M5

Zametne stanice

31. Transgenske analize mutacije u glodavaca primjerene su za istraživanja poticanja mutacije gena u zametnim stanicama mužjaka (7) (8) (27), kod kojih su dobro definirani trenutak i kinetika spermatogeneze (27). Mali brojevi jajnih stanica dostupnih za analizu, čak i nakon superovulacije i činjenica da nema sinteze DNK-a u jajnim stanicama, ograničavaju utvrđivanje mutacije zametne stanice u ženki upotrebom transgenskih analiza (31).

32. Vremena uzimanja uzoraka za muške zametne stanice treba odabrati tako da se uzorkuje raspon izloženih vrsta stanica tijekom razvoja zametne stanice te tako da ciljni stupanj tijekom uzimanja uzoraka ostvari dovoljnu izloženost. Vrijeme potrebno za napredovanje zametne stanice u razvoju iz spermatogonijalne matične stanice u zreli spermij koji dolazi do sjemenovoda ili repa epididimisa je ~49 dana u miša (36) i ~70 dana u štakora (34) (35). Nakon razdoblja izloženosti od 28 dana uz daljnja tri dana uzorkovanja akumulirana sperma prikupljena iz sjemenovoda ili repa epididimisa (7) (8) predstavlja populaciju stanica izloženih tijekom otprilike druge polovine spermatogeneze, koja uključuje mejotsko i postmejotsko razdoblje no ne i spermatogonijalno razdoblje ili razdoblje matične stanice. Da bi se na odgovarajući način uzorkovale stanice u sjemenovodu ili repu epididimisa koje su bile spermatogonijalne matične stanice tijekom razdoblja izloženosti, potrebno je dodatno vrijeme uzorkovanja od najmanje sedam tjedana (miševi) ili deset tjedana (štakor) nakon završetka tretmana.

33. Stanice koje se istisnu iz sjemenovoda nakon 28 + 3 dnevnog režima sastoje se od miješane populacije obogaćene za sve stupnjeve razvoja zametnih stanica (7) (8). Uzorkovanje tih stanica za potrebe utvrđivanja genskih mutacija ne osigurava dovoljno preciznu procjenu stupnjeva na kojima dolazi do mutacija zametnih stanica kao što se to može dobiti iz uzorkovanja spermija iz sjemenovoda ili repa epididimisa (s obzirom na to da postoji niz vrsta zametnih stanica koje su uzorkovane iz sjemenovoda te će isto tako biti prisutne i određene somatske stanice koje kontaminiraju tu populaciju stanica). Međutim, uzorkovanje stanica iz sjemenovoda pored spermija iz sjemenovoda ili repa epididimisa nakon 28 + 3-dnevnog režima uzorkovanja moglo bi u određenom omjeru obuhvatiti stanice izložene tijekom većine faza razvoja zametne stanice i moglo bi biti korisno za utvrđivanje određenih mutagena zametnih stanica.

Promatranja

34. Opća klinička opažanja treba provoditi najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon primjene doze. Zdravstveno stanje životinja treba bilježiti. Najmanje dva puta dnevno treba provjeravati ima li slučajeva pobolijevanja ili smrti životinja. Sve životinje treba vagati barem jednom tjedno i prilikom žrtvovanja. Unos hrane treba mjeriti najmanje na tjednoj osnovi. Ako se ispitivana tvar daje s vodom za piće, treba mjeriti i unos vode, i to barem na tjednoj razini. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje viška toksičnosti trebale bi se eutanazirati prije dovršetka ispitnog razdoblja (23).

▼M5

Prikupljanje tkiva

35. Smisao prikupljanja tkiva treba jasno definirati. Budući da je moguće proučavati poticanje mutacije u gotovo bilo kojem tkivu, odabir tkiva koje je potrebno prikupiti trebao bi se temeljiti na razlogu provođenja istraživanja i bilo kojim postojećim podacima o mutagenosti, kancerogenosti ili toksičnosti za kemikaliju koja se istražuje. Važni čimbenici koje treba uzeti u obzir trebali bi uključivati put primjene (na temelju vjerojatnog ljudskog puta izloženosti ili više njih), predviđeni raspored tkiva i moguće mehanizme djelovanja. U nedostatku bilo kakvih dodatnih podataka treba prikupiti nekoliko relevantnih somatskih tkiva. Ona bi trebala predstavljati brzo i sporo razmnožavajuća tkiva kao i ona tkiva na mjestu dodira. K tome, spermiji iz sjemenovoda ili repa epididimisa i zametne stanice u razvoju iz sjemenovoda (kako je opisano u stavcima 32. i 33.) trebali bi se prikupiti i pohraniti za slučaj da bude potrebna buduća analiza mutagenosti zametnih stanica. Treba zabilježiti mase organa, a za veće organe treba prikupiti isto područje od svih životinja.

Pohranjivanje tkiva i DNK-a

36. Tkiva (ili homogenati tkiva) bi se trebala pohraniti na ili ispod – 70 °C i upotrebljavati za izoliranje DNK-a u roku od 5 godina. Izolirani DNK, pohranjen u hladnjaku na 4 °C u odgovarajućem puferu trebao bi se upotrijebiti optimalno za analize mutacija u roku od godinu dana.

Odabir tkiva za analizu mutacije

37. Odabir tkiva trebao bi se temeljiti na razmatranjima kao što su: 1) put primjene ili mjesto prvog kontakta (tj. žljezdani želudac ako je primjena oralna, pluća ako je primjena obavljena inhalacijom, ili koža ako je upotrijebljena površinska primjena); i 2) farmakokinetički parametri primijećeni u općim istraživanjima toksičnosti, koji ukazuju na stanje tkiva, zadržavanje ili akumulaciju, ili ciljnih organa u pogledu toksičnosti. Ako se istraživanja obavljaju nakon istraživanja kancerogenosti, treba uzeti u obzir ciljna tkiva u pogledu kancerogenosti. Odabir tkiva za analizu trebao bi maksimizirati pronalaženje kemikalija koje djeluju izravno kao in vitro mutageni, bilo da se ubrzano metaboliziraju, lako reagiraju ili se slabo apsorbiraju ili oni za koje se ciljno tkivo utvrđuje s pomoću puta primjene (6).

38. U nedostatku osnovnih informacija i uzimajući u obzir razmatranja u vezi s mjestom kontakta zbog puta primjene, jetra i barem jedno tkivo koje se brzo dijeli (npr. žljezdani želudac, koštana srž) trebali bi se procijeniti u pogledu mutagenosti. U većini se slučajeva navedeni zahtjevi mogu ostvariti s pomoću analiza dvaju pomno odabranih tkiva, no u nekim je slučajevima potrebno je tri ili više vrsta. Ako postoje razlozi koji se posebno odnose na učinke matičnih stanica, uključujući i pozitivne odgovore na somatske stanice, tkiva zametnih stanica trebala bi se procijeniti u pogledu mutacija.

Metode mjerenja

39. Za preporučene transgenske modele dostupne su standardne laboratorijske ili objavljene metode za otkrivanje mutacija: lacZ lambde bakteriofaga i plazmida (30); lacI miša (2) (18); gpt delta miša (22); gpt delta štakora (28); cII (17). Modifikacije bi trebale biti opravdane i odgovarajuće dokumentirane. Podaci iz višestrukih pakiranja mogu se agregirati i upotrijebiti da bi se postigao odgovarajući broj plakova ili kolonija. Međutim, potreba za velikim brojem reakcija pakiranja za postizanje odgovarajućeg broja plakova može biti pokazatelj slabe kvalitete DNK-a. U takvim slučajevima

▼M5

podaci bi se trebali oprezno razmatrati jer bi mogli biti nepouzdani. Optimalni broj plakova ili kolonija po uzroku DNK-a ovisi o statističkoj vjerojatnosti utvrđivanja odgovarajućeg broja mutanata prema određenoj spontanoj učestalosti mutacije. Općenito, potreban je minimum od 125 000 do 300 000 plakova kada je spontana učestalost mutacije u rangu 3×10^{-5} (15). U pogledu analize Big Blue® lacI, važno je dokazati da se cijeli raspon mutacije boje fenotipa može utvrditi uključivanjem odgovarajućih kontrola boja paralelno sa svakim plakom. Tkiva i njihovi uzorci (predmeti) trebali bi se obraditi i analizirati upotrebom ujednačenog postupka, u okviru kojeg se istodobno obrađuju predmeti iz kontrolne skupine nosača/otapala, pozitivne kontrolne skupine (ako je upotrijebljena) ili pozitivne kontrolne DNK-a (prema potrebi) i svaka obrađena skupina.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

40. Podatke za pojedinačne životinje treba prikazati u tabličnom obliku. Pokusna jedinica je životinja. Izvješće bi trebalo uključivati ukupni broj jedinica koje stvaraju plakove (PFU) ili jedinica koje stvaraju koloniju (CFU), broj mutanata i učestalost mutacija za svako tkivo svake životinje. Postoje li višestruke reakcije u vezi s pakiranjem/spašavanjem, treba izvijestiti o broju reakcija po uzorku DNK-a. Dok podatke za svaku pojedinu reakciju treba zadržati, potrebno je izvijestiti o ukupnom pfu-u ili cfu-u. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima u skladu sa stavkom 34. Svi rezultati u vezi sa sekvenciranjem trebali bi se predstaviti za svakog analiziranog mutanta te treba prikazati i vezane izračune o učestalosti mutacije za svaku životinju i tkivo.

Statističko vrednovanje i tumačenje rezultata

41. Postoji više kriterija za utvrđivanje pozitivnog rezultata, kao na primjer povećanje učestalosti mutacije povezano s dozom ili jasno povećanje učestalosti mutacije utvrđeno kod skupine na koju je primijenjena samo jedna doza, u usporedbi s kontrolnom skupinom otapala/nosača. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupili odgovarajući podaci za analizu doze i odgovora. Dok bi biološki značaj rezultata trebao biti od primarne važnosti, mogu se upotrebljavati odgovarajuće statističke metode kao pomoć u procjeni rezultata ispitivanja (4) (14) (15) (25) (26). Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi obuhvaćati životinju kao eksperimentalnu jedinicu.

42. Ispitivana tvar čija ispitivanja ne ispunjavaju gornje kriterije u ovom se sustavu ne smatra mutagenom. Treba zadržati i mogućnost negativne pričuve.

43. Za analize sekvenciranja DNK-a dostupno je nekoliko statističkih pristupa za pomoć u tumačenju rezultata (1) (5) (9) (19).

44. Razmatranja o tome jesu li primijećene vrijednosti unutar ili izvan povijesnog kontrolnog raspona može pomoći kod usmjeravanja pri procjeni biološkog značaja odgovora (32).

▼M5

Izvješće o ispitivanju

45. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

— identifikacijski podaci i broj CAS, ako su raspoloživi,

— izvor, broj lota ako je dostupan,

— fizikalna priroda i čistoća,

— fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provođenje istraživanja,

— stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako je poznata.

Otapalo/nosač

— opravdanost odabira nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako je poznata,

— priprema prehrambenih pripravaka, pitke vode ili inhalacijskih pripravaka,

— analitička određivanja pripravaka (tj. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije).

Ispitne životinje

— vrste i soj te obrazloženje njihova odabira,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon tjelesnih masa, srednje i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti

— podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),

— podaci iz ispitivanja za određivanje raspona,

— podloge za odabir visine doze,

— pojedinosti o pripremi kemikalija za ispitivanje,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— podloge za odabir puta primjene,

— metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, kada je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom je obavljano promatranje i vaganje životinje,

— metode provjere dosega ispitne kemikalije u ciljno tkivo, ili općenite cirkulacije, ako se dobiju negativni rezultati,

▼M5

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) i faktor za preračunavanje koncentracije ispitivane tvari u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu i prehrana, ako je primjenjivo,

— podaci o kvaliteti hrane i vode,

— iscrpni opis tretmana i rasporeda uzimanja uzoraka i opravdanje za odabire,

— metoda eutanazije,

— postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,

— metode izoliranja genomskog DNK-a glodavca, spašavanje transgena iz genomskog DNK-a i prenošenje transgenskog DNK-a u bakteriju domaćina,

— izvor i brojevi lota svih stanica, opreme i reagensa (ako je primjenjivo),

— metode popisivanja mutanata,

— metode molekularne analize mutanata i upotreba u ispravljanju za klonalitet i/ili izračunavanje učestalosti mutacija, ako je primjenjivo.

Rezultati

— stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući i znakove toksičnosti,

— mase tijela i organa prije žrtvovanja,

— za svako tkivo/životinju, broj mutanata, broj procijenjenih plakova ili kolonija, učestalost mutacije,

— za svaku skupinu tkiva/životinje, broj reakcija pakiranja po uzorku DNK-a, ukupni broj mutanata, prosječna učestalost mutacije, standardno odstupanje,

— odnos doza i reakcija, ako je moguće,

— za svako tkivo/životinju, broj neovisnih mutanata i prosječna učestalost mutacije, kada je provedena molekularna analiza mutacija,

— paralelni podaci i podaci o negativnim kontrolama iz prijašnjih ispitivanja s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,

— podaci paralelne pozitivne kontrole (ili neparalelne pozitivne kontrole DNK-a),

— analitička određivanja, ako su dostupna (tj. koncentracije DNK-a koje se upotrebljavaju u pakiranju, podaci o sekvenciranju DNK-a),

— primijenjene statističke analize i metode.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

▼M5

LITERATURA

(1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987.), Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra, J. Mol. Biol., 194: 391. – 396.

(2) Bielas, J.H. (2002.), A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement, Mutation Res., 518: 107. – 112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995.), Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations Nature, 377(6550): 657. – 659.

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995.), Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice, Environ. Mol. Mutagen, 25(3): 246. – 255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996.), Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency, Environ. Mol. Mutagen, 28: 405. – 413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999.), Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens, Mutagenesis, 14(1): 141. – 151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995.), Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7485. – 7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997.), Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells, Mutation Res., 388(2. – 3.): 197. – 212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000.), „Bayesian Analysis of Mutational Spectra", Genetics, 156: 1411. – 1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989.), Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971. – 7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993.), A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host, Biotechniques, 14(3): 326., 330.

(12) Erikson, R.P. (2003.), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer, Mutation Res., 543.: 125. – 136.

(13) Erikson, R.P. (2010.), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update, Mutation Res., 705.: 96. – 106..

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998.), Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 13(3): 249. – 255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000.), In vivo Transgenic Mutation Assays, Environ. Mol. Mutagen., 35: 253. – 259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003.), Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays, Environ. Mol. Mutagen., 41.: 1. – 6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996.), Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(17): 9073. – 9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990.), The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing, Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212. – 218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008.), Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis, Carcinogenesis, 29(4): 772. – 778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996.), A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections, Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465. – 470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999.), Spi – Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice, Environ. Mol. Mutagen., 34(1): 9. – 15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000.), Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays, Mutation Res., 455(1. – 2.): 191. – 215.

(23) 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, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(24) OECD (2009.), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009.)7, OECD, Pariz.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995.), Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay, Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231. – 245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997.), Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study, Mutation. Res., 388(2. – 3.): 249. – 289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006.), Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays, Mutation. Res., 598: 164. – 193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010.), Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers, Toxicol. Sci., 114(1): 71. – 78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003.), In vivo Transgenic Mutation Assays, Mutation Res., 540.: 141. – 151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996.), Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo in: G. Pfeifer (ed.), Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, str. 391. – 410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005.), A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells, Mutation Res., 578(1. – 2.): 117. – 123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011.), Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011.), Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^{o} 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Pariz.

(34) Clermont, Y. (1972.), Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52.: 198. – 236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006.), The Epididymis, in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, str. 1071. – 1148.

(36) Russell, L.B. (2004.), Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse, Genetica, 122: 25. – 36.

▼M5

Dodatak

DEFINICIJE

Razdoblje primjene: ukupno razdoblje tijekom kojeg se doza primjenjuje na životinju.

Supstitucija baznog para: vrsta mutacije koja uzrokuje zamjenu jedinstvene nukleotidne baze DNK-a drugom nukleotidnom bazom DNK-a.

Kapsid: omotač od proteina koji obavija česticu virusa.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Klonalno širenje: proizvodnja više stanica iz jedne (mutirane) stanice.

Jedinica koja stvara koloniju (CFU): mjera održivog broja bakterija.

Konkatamer: duga neprekinuta biomolekula sastavljena od višestrukih identičnih preslika povezanih u seriju.

Cos site: 12-nukleotidni segment jednolančanog DNK-a koji postoji na oba kraja bakteriofaga dvolančanoga genoma lambde.

Brisanje: mutacija zbog koje genom gubi jedan ili više (slijednih) nukleotida.

Elektroporacija: primjena električnih impulsa da bi se povećala nepropusnost staničnih membrana.

Endogeni gen: gen koji je svojstven genomu.

Ekstrabinomijalna varijacija: veća varijabilnost u ponovljenim procjenama udjela populacije nego što bi se očekivalo da populacija ima binomijalnu distribuciju.

Pomak okvira mutacija: genetska mutacija koju uzrokuju unošenja ili brisanja određenog broja nukleotida koji nije jednomjerno djeljiv s tri unutar slijeda DNK-a koji je kodiran za protein/peptid.

Unošenje: dodavanje jednog ili više baznih parova nukleotida u slijed DNK-a.

Jackpot: velik broj mutanata koji se pojavljuju kolonijalnim širenjem iz jedinstvene mutacije.

Velika brisanja: brisanja u DNK-a više od nekoliko kilobaza (koja se učinkovito otkrivaju odabirom Spi – i lacZ plazmidnim analizama.).

Ligacija: kovalentno povezivanje dva kraja molekula DNK-a s pomoću ligacije DNK-a.

Mitogen: kemikalija koja potiče stanicu na započinjanje stanične podjele te tako potiče mitozu (tj. podjelu stanice).

Neutralni gen: gen na koji ne utječu ni pozitivni ni negativni selektivni pritisci.

Pakiranje: sinteza infektivnih čestica faga iz pripravka kapsida faga i rubnih proteina i konkatamera faga molekule DNK-a. Obično se upotrebljava da bi se grupirao DNK kloniran na lambda vektor (razdvojena cos sites) u infektivne lambda čestice.

Učinkovitost pakiranja: učinkovitost kojom se pakirani bakteriofazi regeneriraju u bakteriji domaćinu.

▼M5

Jedinica koja stvara plakove (PFU): mjera održivog broja bakteriofaga.

Točkasta mutacija: općeniti pojam za mutaciju koja utječe samo na manju sekvencu DNK-a uključujući manja unošenja, brisanja i supstitucije baznih parova.

Pozitivna selekcija: metoda kojom se omogućava preživljavanje samo mutanata.

Gen koji daje informacije: gen čiji je proizvod mutantskoga gena jednostavno uočljiv.

Vrijeme uzorkovanja: kraj vremenskog razdoblja, prije žrtvovanja, tijekom kojeg se kemikalija ne primjenjuje i tijekom kojeg se lezije DNK-a pričvršćuju na stabilne mutacije.

Prijenosni vektor: vektor konstruiran tako da se može razmnožavati u dvije različite vrste domaćina; u skladu s time, DNK unesen u prijenosni vektor može se ispitivati ili se njime može upravljati u dvije različite vrste stanica ili dva različita organizma.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju tom ispitnom metodom.

Transgenski: u vezi s ili koji je organizam čiji je genom promijenjen prijenosom gena iz neke druge vrste.

▼M7

B.59. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN CHEMICO:* TEST IZRAVNE REAKTIVNOSTI PEPTIDA (*DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY* – DPRA)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 442C (2015.). Tvar koja izaziva preosjetljivost kože tvar je koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definirana u Globalno usklađenom sustavu Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EZ) 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u) ([1]). U ovoj se ispitnoj metodi opisuje postupak *in chemico* (test izravne reaktivnosti peptida – DPRA) koji treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sustavom UN GHS i Uredbom o CLP-u.

Postoji opća suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o kemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažeto su prikazane u obliku puta nastanka štetnog ishoda (engl. *Adverse Outcome Pathway* – AOP) (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do štetnog učinka, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa u ljudi ili kontaktne preosjetljivosti u glodavaca. U AOP-u koji se odnosi na izazivanje preosjetljivosti kože početni je molekularni događaj stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih tvari i nukleofilnih središta u bjelančevinama kože.

U procjenama preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (3.)), ispituje se i faza indukcije i faza elicitacije preosjetljivosti kože. Ispitivanja na miševima, tj. analiza lokalnih limfnih čvorova (LLNA, ispitna metoda B.42. (4.)) i njezine dvije inačice u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izotopi, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (5.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (6.)), pri čemu se svima trima ispituje isključivo odgovor u fazi indukcije, isto tako su prihvaćena jer predstavljaju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja i objektivnog mjerenja faze indukcije preosjetljivosti kože.

U novije se vrijeme *in chemico* te *in vitro* ispitne metode koje se temelje na mehanističkom pristupu smatraju znanstveno valjanima za ocjenjivanje opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože povezanih s kemikalijama. Međutim, potrebne su kombinacije metoda koje ne uključuju ispitivanja na životinjama (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (engl. *Integrated Approaches to Testing and Assessment* – IATA), kako bi se mogla u cijelosti zamijeniti ispitivanja na životinjama koja su trenutačno u upotrebi, s obzirom na ograničenu mehanističku domenu AOP-a svake od trenutačno dostupnih ispitnih metoda koje ne uključuju ispitivanja na životinjama (2., 7.).

Metoda DPRA predlaže se za ispitivanje početnog molekularnog događaja u AOP-u preosjetljivosti kože, posebice reaktivnosti bjelančevina, kvantificiranjem reaktivnosti ispitivanih kemikalija u odnosu na modelne sintetičke peptide koji sadržavaju lizin ili cistein (8.). Na temelju postotaka potrošnje peptida koji sadržavaju cistein i peptida koji sadržavaju lizin tvari se potom razvrstavaju u jedan od četiriju razreda reaktivnosti, koji služe kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože (9.).

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

▼M7

Metoda DPRA ocijenjena je validacijskom studijom koju je proveo Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) i potom neovisnim stručnim pregledom koji je izvršio EURL ECVAM-ov Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC) te je utvrđeno da je znanstveno valjana (10.) za primjenu u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih metodom DPRA u kombinaciji s ostalim informacijama (11., 12., 13., 14.).

Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA, PRIMJENJIVOST I OGRANIČENJA

Jasno je utvrđena korelacija između reaktivnosti bjelančevina i potencijala izazivanja preosjetljivosti kože (15., 16., 17.). Međutim, iako je vezanje na bjelančevine početni molekularni događaj u AOP-u preosjetljivosti kože, to je samo jedan od ključnih događaja pa informacije o reaktivnosti bjelančevina dobivene ispitnim metodama i metodama koje ne uključuju ispitivanje možda same po sebi neće biti dovoljne za donošenje zaključka o odsutnosti potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga bi podatke dobivene ovom ispitnom metodom trebalo razmatrati u kontekstu integriranih pristupa poput IATA-e te ih kombinirati s ostalim dodatnim informacijama, npr. onima dobivenima *in vitro* pokusima kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s kemijski analognim tvarima.

Ova se ispitna metoda može upotrijebiti, u kombinaciji s drugim dodatnim informacijama, kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. onih koje su razvrstane u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, u kontekstu IATA-e. Ova se ispitna metoda ne može upotrijebiti kao jedina metoda za razvrstavanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definirane u sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, ovisno o regulatornom okviru pozitivan rezultat dobiven metodom DPRA može se samostalno upotrijebiti za razvrstavanje kemikalije u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u.

Dokazano je da se ispitna metoda DPRA može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva u izvođenju analiza s pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Može se očekivati da će za predviđanja do kojih se dođe s pomoću ove ispitne metode stupanj obnovljivosti biti reda veličine 85 % unutar laboratorija i 80 % između laboratorija (10.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (18.) i objavljenim studijama (19.) općenito pokazuju da točnost metode DPRA u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost (tj. onih iz kategorije 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 80 % (N = 157) uz osjetljivost od 80 % (88/109) i specifičnost od 77 % (37/48) u usporedbi s rezultatima dobivenima metodom LLNA. Veća je vjerojatnost da će se metodom DPRA podcijeniti kemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B sustava UN GHS / prema Uredbi o CLP-u) nego što će se podcijeniti kemikalije koje pokazuju veliki potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A sustava UN GHS / prema Uredbi o CLP-u) (18., 19.). Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode DPRA kao samostalne ispitne metode samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama prethodno navedenog stavka 9. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da metoda LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod vrste za koju se žele dobiti rezultati, tj. ljudi. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se metoda DPRA može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (8., 9., 10., 19.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost metode DPRA kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože.

▼M7

U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost metode DPRA za ispitivanje tvari i/ili smjesa. Ova ispitna metoda nije primjenjiva za ispitivanje spojeva metala jer je poznato da oni reagiraju s bjelančevinama drugim mehanizmima, a ne stvaranjem kovalentnih veza. Ispitivana kemikalija trebala bi biti topljiva u odgovarajućem otapalu pri konačnoj koncentraciji od 100 mM (vidjeti stavak 18.). Međutim, ispitivane kemikalije koje nisu topljive pri toj koncentraciji mogu se ispitati pri nižim koncentracijama pri kojima jesu topljive. U tom se slučaju pozitivan rezultat može upotrijebiti kao potpora identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja izaziva preosjetljivost kože, ali se na temelju negativnog rezultata ne bi smio izvući čvrsti zaključak o nepostojanju reaktivnosti. Trenutačno su dostupne ograničene informacije o primjenjivosti metode DPRA na smjese poznatog sastava (18., 19.). Unatoč tomu, smatra se da je metoda DPRA tehnički primjenjiva za ispitivanje višekomponentnih tvari i smjesa poznatog sastava (vidjeti stavak 18.). Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Trenutačni model predviđanja ne može se upotrijebiti za složene smjese nepoznatog sastava ili za tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složene reakcijske proizvode ili biološke materijale (tj. UVCB tvari) zbog utvrđenog molarnog omjera između ispitivane kemikalije i peptida. U tu je svrhu potrebno razviti novi model predviđanja koji se temelji na gravimetrijskom pristupu. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija kemikalija, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije kemikalija.

Ova je ispitna metoda *in chemico* metoda koja ne uključuje metabolički sustav. Ovom se ispitnom metodom ne mogu otkriti kemikalije koje zahtijevaju enzimsku bioaktivaciju da bi mogle pokazati svoj potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. prohapteni). U nekim su slučajevima ovom ispitnom metodom ispravno otkrivene kemikalije koje nakon abiotičke transformacije postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost (tj. prehapteni) (18.). S obzirom na navedeno, negativne rezultate dobivene ispitnom metodom trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja te u povezanosti s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. Ispitivane kemikalije koje se ne vežu kovalentnom vezom na peptid, ali potiču njegovu oksidaciju (tj. dimerizaciju cisteina), mogle bi dovesti do mogućeg precjenjivanja potrošnje peptida, što bi za posljedicu moglo imati moguća lažno pozitivna predviđanja i/ili razvrstavanje kemikalije u viši razred reaktivnosti (vidjeti stavke 29. i 30.).

Kao što je opisano, metoda DPRA pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa poput IATA-e, mogla bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (11.). Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni metodom DPRA mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad, koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.

NAČELO ISPITIVANJA

DPRA je *in chemico* metoda kojom se količinski određuje preostala koncentracija peptida koji sadržava cistein ili lizin nakon 24 sata inkubacije s ispitivanom kemikalijom pri temperaturi od 25 ± 2,5 °C. Sintetički peptidi sadržavaju fenilalanin radi lakšeg otkrivanja. Relativna koncentracija peptida mjeri se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s gradijentnim eluiranjem i UV detekcijom na 220 nm. Potom se izračunavaju postotci potrošnje peptida koji sadržavaju cistein i peptida koji sadržavaju lizin te se te vrijednosti upotrebljavaju u modelu predviđanja (vidjeti stavak 29.) kojim se omogućuje razvrstavanje ispitivane kemikalije u jedan od četiriju razreda reaktivnosti, koji se potom upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

▼M7

Prije rutinske primjene ove ispitne metode laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost izvodeći metodu na deset tvari navedenih u Dodatku 2. koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

POSTUPAK

Ova se ispitna metoda temelji na protokolu DPRA DB-ALM br. 154 (20.), koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM. Preporučuje se primijeniti taj protokol pri provedbi i primjeni metode u laboratoriju. U nastavku su opisane glavne komponente i postupci za DPRA. Ako se upotrebljava alternativni sustav HPLC, trebalo bi dokazati da je on u skladu s validiranim sustavom opisanim u protokolu DB-ALM (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti iz Dodatka 2.).

Pripremanje peptida koji sadržavaju cistein ili lizin

Radne otopine sintetičkih peptida koji sadržavaju cistein (Ac-RFAA**C**AA-COOH) i lizin (Ac-RFAA**K**AA-COOH), čistoće veće od 85 %, po mogućnosti u rasponu od 90 do 95 %, trebalo bi pripremiti svježe neposredno prije inkubacije s ispitivanom kemikalijom. Konačna bi koncentracija peptida koji sadržava cistein trebala iznositi 0,667 mM u fosfatnom puferu pH-vrijednosti 7,5, dok bi konačna koncentracija peptida koji sadržava lizin trebala iznositi 0,667 mM u amonijevom acetatnom puferu pH-vrijednosti 10,2. Analitički ciklus u HPLC-u trebalo bi programirati tako da trajanje analize s pomoću HPLC-a bude kraće od 30 sati. U okviru sustava HPLC koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji i opisan u ovoj ispitnoj metodi, u jednom se ciklusu HPLC-a može analizirati do 26 uzoraka (koji uključuju ispitivanu kemikaliju, pozitivnu kontrolu i odgovarajući broj kontrola s otapalom koji ovisi o broju pojedinačnih otapala upotrijebljenih u testu, od kojih se svaki ispituje kao triplikat). U svim bi ponovljenim uzorcima koji se analiziraju u istoj analitičkoj seriji trebalo upotrijebiti identične radne otopine peptida koji sadržavaju cistein odnosno lizin. Preporučuje se dokazati ispravnu topljivost pojedinačnih šarži peptida prije njihove upotrebe.

Priprema ispitivane kemikalije

Prije izvođenja pokusa trebalo bi ocijeniti topljivost ispitivane kemikalije u odgovarajućem otapalu u skladu s postupkom solubilizacije opisanim u protokolu DPRA DB-ALM (20.). Odgovarajuće otapalo je ono koje u cijelosti otopi ispitivanu kemikaliju. S obzirom na to da se kod metode DPRA ispitivana kemikalija inkubira u velikom omjeru s peptidima koji sadržavaju cistein ili lizin, smatra se da je vizualna provjera stvaranja bistre otopine dovoljna kako bi se utvrdilo je li se ispitivana kemikalija (i sve njezine komponente ako je riječ o višekomponentnoj tvari ili smjesi) dobro otopila. Prikladna su otapala acetonitril, voda, smjesa vode i acetonitrila u omjeru 1:1, izopropanol, aceton ili smjesa acetona i acetonitrila u omjeru 1:1. Mogu se upotrijebiti i druga otapala pod uvjetom da ne utječu na stabilnost peptida, što se provjerava s pomoću referentnih kontrola C (tj. uzoraka koji se sastoje samo od peptida otopljenog u odgovarajućem otapalu; vidjeti Dodatak 3.). Ako ispitivana kemikalija nije topljiva ni u jednom od navedenih otapala, trebalo bi je, kao zadnju mogućnost, pokušati otopiti u 300 μL DMSO-a te nastalu otopinu razrijediti s 2 700 μL acetonitrila; ako ispitivana kemikalija nije topljiva u toj smjesi, istu količinu ispitivane kemikalije trebalo bi pokušati otopiti u 1 500 μL DMSO-a te nastalu otopinu razrijediti s 1 500 μL acetonitrila. Ispitivanu kemikaliju trebalo bi prethodno odvagati u staklene bočice te neposredno prije ispitivanja otopiti u odgovarajućem otapalu kako bi se pripremila otopina koncentracije 100 mM. Za smjese i višekomponentne tvari poznatog sastava trebalo bi odrediti jedan stupanj čistoće, koji se utvrđuje na temelju zbroja udjela njihovih sastojaka (isključujući vodu), te jednu prividnu molekularnu masu, koja se utvrđuje uzimajući u obzir molekularnu masu svake komponente smjese (isključujući vodu) i njihove pojedinačne udjele. Tako dobiveni stupanj čistoće i prividna molekularna masa potom se

▼M7

upotrebljavaju za izračunavanje mase ispitivane kemikalije koja je potrebna za pripremu otopine koncentracije 100 mM. U slučaju polimera za koje se ne može odrediti dominantna molekularna masa, za pripremu otopine koncentracije 100 mM može se uzeti u obzir molekularna masa monomera (ili prividna molekularna masa različitih monomera od kojih se polimer sastoji). Međutim, pri ispitivanju smjesa, višekomponentnih tvari ili polimera poznatog sastava trebalo bi predvidjeti ispitivanje i čiste kemikalije. U slučaju tekućina čistu bi kemikaliju trebalo ispitati kao takvu, bez prethodnog razrjeđivanja, inkubiranjem u molarnom omjeru 1:10 i 1:50 s peptidima koji sadržavaju cistein odnosno peptidima koji sadržavaju lizin. U slučaju krutih tvari ispitivanu bi kemikaliju trebalo otopiti do najviše topljive koncentracije, u istom otapalu koje se upotrebljava za pripremu otopine koncentracije 100 mM. Potom bi je trebalo ispitati kao takvu, bez dodatnog razrjeđivanja, inkubiranjem u omjeru 1:10 i 1:50 s peptidima koji sadržavaju cistein odnosno peptidima koji sadržavaju lizin. Ako se ispitivanjem otopine prividne koncentracije od 100 mM i čiste kemikalije dobiju sukladni rezultati (reaktivni i nereaktivni), trebalo bi biti moguće donošenje čvrstog zaključka o rezultatu.

Priprema pozitivne kontrole, referentnih kontrola i kontrola koelucije

Cimetni aldehid (CAS 104-55-2; prehrambene čistoće ≥95 %) trebalo bi upotrijebiti kao pozitivnu kontrolu (PK) u koncentraciji od 100 mM u acetonitrilu. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole koje po mogućnosti daju srednje vrijednosti potrošnje, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti za analitičku seriju. Osim toga, u analitički ciklus HPLC-a trebalo bi uključiti i referentne kontrole (tj. uzorke koji sadržavaju samo peptid otopljen u odgovarajućem otapalu), koje se upotrebljavaju kako bi se prije analize provjerila prikladnost sustava HPLC (referentne kontrole A), stabilnost referentnih kontrola tijekom vremena (referentne kontrole B) te da otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije ne utječe na postotak potrošnje peptida (referentne kontrole C) (vidjeti Dodatak 3.). Za svaku se kemikaliju upotrebljava odgovarajuća referentna kontrola kako bi se izračunao postotak potrošnje peptida za tu kemikaliju (vidjeti stavak 26.). Osim toga, za svaku od kemikalija koje se analiziraju trebalo bi uključiti u analitičku seriju i kontrolu koelucije, koja se sastoji samo od ispitivane kemikalije i služi za otkrivanje moguće koelucije ispitivane kemikalije s peptidom koji sadržava lizin ili cistein.

Inkubiranje ispitivane kemikalije s otopinom peptida koji sadržava cistein i peptida koji sadržava lizin

Otopinu peptida koji sadržava cistein i otopinu peptida koji sadržava lizin trebalo bi inkubirati s ispitivanom kemikalijom u omjeru 1:10 odnosno 1:50 u staklenim bočicama za automatski dodavač uzoraka. Ako se odmah nakon dodavanja otopine ispitivane kemikalije u otopinu peptida opazi precipitacija do koje dolazi zbog toga što je ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi, neće se moći sa sigurnošću utvrditi koliko je ispitivane kemikalije ostalo u otopini da reagira s peptidom. U tom se slučaju stoga pozitivan rezultat ipak može upotrijebiti, ali negativan rezultat nije siguran i trebalo bi ga pažljivo tumačiti (vidjeti i odredbe stavka 11. za ispitivanje kemikalija koje nisu topljive do koncentracije od 100 mM). Reakcijsku otopinu trebalo bi držati u mraku na temperaturi od 25 ± 2,5 °C tijekom 24 ± 2 sata prije izvođenja analize s pomoću HPLC-a. Svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo analizirati kao triplikat za oba peptida. Uzorke bi trebalo vizualno pregledati prije izvođenja analize s pomoću HPLC-a. Ako se primijeti precipitacija ili razdvajanje faza, kao mjera opreza uzorci se mogu centrifugirati pri maloj brzini (100 – 400 xg) kako bi se talog slegnuo na dno bočice jer bi velike količine taloga mogle začepiti kromatografske cijevi ili kolone. Ako se precipitacija ili razdvajanje faza primijeti nakon inkubacijskog razdoblja, potrošnja peptida mogla bi biti podcijenjena te se u slučaju negativnog rezultata ne može izvući dovoljno pouzdan zaključak o nepostojanju reaktivnosti.

▼M7

Priprema kalibracijske krivulje standarda za HPLC

Potrebno je izraditi kalibracijsku krivulju standarda za peptide koji sadržavaju cistein i za peptide koji sadržavaju lizin. Standarde peptida trebalo bi pripremiti u otopini s 20 % ili 25 % acetonitrila: puferirati fosfatnim puferom (pH 7,5) za peptid koji sadržava cistein i amonijevim acetatnim puferom (pH 10,2) za peptid koji sadržava lizin. Koristeći se standardima dobivenima serijskim razrjeđenjem radne otopine peptida (0,667 mM), trebalo bi pripremiti šest kalibracijskih otopina koje obuhvaćaju raspon od 0,534 do 0,0167 mM. U kalibracijsku krivulju standarda trebalo bi uključiti i slijepu probu koja sadržava pufer za razrjeđivanje. Prikladna kalibracijska krivulja mora imati koeficijent $r^2 > 0,99$.

Priprema i izvođenje analize s pomoću HPLC-a

Prije izvođenja analize trebalo bi provjeriti prikladnost sustava HPLC. Potrošnja peptida prati se HPLC-om u kombinaciji s UV detektorom (detektorom s nizom fotodioda ili detektorom apsorbancije na fiksnoj valnoj duljini od 220 nm). Odgovarajuća se kolona postavlja u sustav HPLC. U sustavu HPLC postavljenom kako je opisano u validiranom protokolu kao preporučena se kolona upotrebljava Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 mikrona. S tom HPLC-ovom kolonom obrnutih faza cijeli bi sustav prije početka analize trebalo uravnoteživati najmanje dva sata na 30°C s 50 % faze A (0,1 % (v/v) trifluoroctene kiseline u vodi) i 50 % faze B (0,085 % (v/v) trifluoroctene kiseline u acetonitrilu). Analizu HPLC-om trebalo bi izvesti primjenom brzine protoka od 0,35 ml/min i linearnog gradijenta od 10 % do 25 % acetonitrila tijekom deset minuta nakon čega slijedi brzo povećanje acetonitrila na 90 % kako bi se uklonili ostali materijali. Trebalo bi ubrizgati jednake volumene svakog standarda, uzorka i kontrole. Između ubrizgavanja kolonu bi trebalo sedam minuta uravnoteživati na početne uvjete. Ako se upotrebljava drukčija HPLC-ova kolona obrnutih faza, može biti potrebno prilagoditi prethodno opisane parametre kako bi se jamčila odgovarajuća eluacija i integracija peptida koji sadržavaju cistein odnosno lizin, uključujući i ubrizgani volumen, koji može varirati ovisno o upotrijebljenom sustavu (obično u rasponu od 3 do 10 µl). Ako se upotrebljava alternativni sustav HPLC, važno je dokazati njegovu sukladnost s prethodno opisanim validiranim sustavom (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti iz Dodatka 2.). Apsorbancija se očitava na valnoj duljini od 220 nm. Ako se upotrebljava detektor s nizom fotodioda, trebalo bi zabilježiti i apsorbanciju na 258 nm. Potrebno je naglasiti da bi u nekim slučajevima nabavljeni acetonitril mogao negativno utjecati na stabilnost peptida te bi tu mogućnost trebalo ocijeniti pri upotrebi nove šarže acetonitrila. Omjer između površine pikova na 220 nm i površine pikova na 258 nm može poslužiti kao pokazatelj koelucije. Za svaki uzorak omjer u rasponu od 90 % < do < 100 % srednje vrijednosti ([1]) omjera dobivenih za kontrolne uzorke dobar je pokazatelj da nije došlo do koelucije.

Neke ispitivane kemikalije mogu potaknuti oksidaciju peptida koji sadržava cistein. Pik dimeriziranog peptida koji sadržava cistein može se vizualno promatrati. Ako se čini da je došlo do dimerizacije, trebalo bi je zabilježiti jer se postotak potrošnje peptida može precijeniti, što dovodi do lažnih pozitivnih predviđanja i/ili razvrstavanja u viši razred reaktivnosti (vidjeti stavke 29. i 30.).

Analiza HPLC-om za peptide koji sadržavaju cistein i za peptide koji sadržavaju lizin može se provesti istodobno (ako su dostupna dva sustava HPLC) ili u različitim danima. Ako se analize ne provode istog dana, sve bi otopine ispitivane kemikalije trebalo pripremiti svježe za svako ispitivanje. Vrijeme izvođenja analize trebalo bi odrediti tako da se osigura da ubrizgavanje prvog uzorka započne 22 do 26 sati nakon miješanja ispitivane kemikalije s otopinom peptida.

([1]) U cijelom ovom dokumentu pojam „srednja vrijednost” znači aritmetička sredina.

▼M7

Analitički ciklus u HPLC-u trebalo bi programirati tako da trajanje analize s pomoću HPLC-a bude kraće od 30 sati. U okviru sustava HPLC koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji i opisan u ovoj ispitnoj metodi u jednom se ciklusu HPLC-a može analizirati do 26 uzoraka (vidjeti i stavak 17.). U Dodatku 3. naveden je primjer analitičkog ciklusa HPLC-a.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

Koncentracija peptida koji sadržava cistein ili lizin određuje se fotometrijski u svakom uzorku na valnoj duljini od 220 nm i to tako da se za odgovarajuće pikove izmjeri površina pika (površina ispod krivulje, PIK) te izračuna koncentracija peptida primjenom linearne kalibracijske krivulje utvrđene na temelju standarda.

Postotak potrošnje peptida određuje se u svakom uzorku tako da se izmjeri površina pika te podijeli sa srednjom vrijednošću površine pikova odgovarajućih referentnih kontrola C (vidjeti Dodatak 3.) u skladu s formulom navedenom u nastavku.

$$\textit{Postotak potrošnje peptida} = \left[1 - \left(\frac{\textit{površina pika peptida ubrizg.ponovlj.uzorka}}{\textit{srednja površina pika referentnih kontrola C}}\right)\right] \times 100$$

Kriteriji prihvatljivosti

Kako bi se ispitivanje smatralo valjanim, trebali bi biti ispunjeni sljedeći kriteriji:

a) kalibracijska krivulja standarda trebala bi imati koeficijent $r^2 > 0{,}99$;

b) srednja vrijednost postotka potrošnje peptida kod tri ponovljena uzorka za pozitivne kontrole s cimetnim aldehidom trebala bi iznositi između 60,8 % i 100 % za peptid koji sadržava cistein te između 40,2 % i 69,0 % za peptid koji sadržava lizin, a najveće standardno odstupanje (SD) za ponovljene uzroke s pozitivnom kontrolom trebalo bi iznositi <14,9 % za postotak potrošnje peptida koji sadržava cistein te <11,6 % za postotak potrošnje peptida koji sadržava lizin i

c) srednja vrijednost koncentracije peptida u referentnim kontrolama A trebala bi iznositi 0,50 ± 0,05 mM, a koeficijent varijacije (CV) površina pikova peptida za devet referentnih kontrola B i C u acetonitrilu trebao bi biti < 15,0 %.

Ako nije ispunjen jedan od tih kriterija ili više njih, ispitivanje bi trebalo ponoviti.

Da bi se rezultate dobivene za ispitivanu kemikaliju smatralo valjanima, trebali bi biti ispunjeni sljedeći kriteriji:

a) najveće standardno odstupanje za ponovljene uzorke s ispitivanom kemikalijom trebalo bi iznositi < 14,9 % za postotak potrošnje peptida koji sadržava cistein te < 11,6 % za postotak potrošnje peptida koji sadržava lizin;

b) srednja vrijednost koncentracije peptida za tri referentne kontrole C u odgovarajućem otapalu trebala bi iznositi 0,50 ± 0,05 mM. Ako navedeni kriteriji nisu ispunjeni, podatke bi trebalo odbaciti te bi za tu konkretnu ispitivanu kemikaliju ispitivanje trebalo ponoviti.

Model predviđanja

Za svaku se ispitivanu kemikaliju izračunava srednja vrijednost postotka potrošnje cisteina i postotka potrošnje lizina. Pri izračunavanju srednje vrijednost za negativnu potrošnju uzima se vrijednost „0”. Ako se primjenjuje model predviđanja s cisteinom u omjeru 1:10 / lizinom u omjeru 1:50, koji je prikazan u tablici 1., trebalo bi primjenjivati prag od 6,38 % prosječne potrošnje peptida kao jedan od kriterija za razlikovanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u okviru IATA-e. Primjena modela predviđanja za razvrstavanje ispitivane kemikalije u određeni razred reaktivnosti (tj. niska, umjerena ili visoka reaktivnost) može se pokazati korisnom i za dobivanje informacija potrebnih za procjenu jakosti tvari u okviru IATA-e.

▼M7

Tablica 1.

Model predviđanja s cisteinom 1:10 / lizinom 1:50 ([1])

Srednja vrijednost postotka potrošnje cisteina i lizina	Razred reaktivnosti	Predviđanje na temelju metode DPRA ([2])
0 % ≤ srednja vrijednost postotka potrošnje ≤ 6,38 %	Nepostojeća ili minimalna reaktivnost	Negativno
6,38 % < srednja vrijednost postotka potrošnje ≤ 22,62 %	Niska reaktivnost	Pozitivno
22,62 % < srednja vrijednost postotka potrošnje ≤ 42,47 %	Umjerena reaktivnost	
42,47 % < srednja vrijednost postotka potrošnje ≤ 100 %	Visoka reaktivnost	

([1]) Brojevi se odnose na statistički dobivene granične vrijednosti i nisu povezani s preciznošću mjerenja.
([2]) Predviđanje na temelju metode DPRA trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 9. i 12.

Može se dogoditi da ispitivana kemikalija (tvar ili jedan ili više sastojaka višekomponentne tvari ili smjese) značajno apsorbira na 220 nm te ima isto vrijeme zadržavanja kao i peptid (koelucija). Koelucija se može riješiti tako da se postavke sustava HPLC neznatno prilagode kako bi se još više odvojila vremena eluiranja ispitivane kemikalije i peptida. Ako se za rješavanje problema koelucije upotrebljava alternativni sustav HPLC, trebalo bi dokazati da je on u skladu s validiranim sustavom (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti iz Dodatka 2.). U slučaju pojavljivanja koelucije pik peptida ne može se integrirati te nije moguće izračunati postotak potrošnje peptida. Ako takve ispitne kemikalije koeluiraju i s peptidima koji sadržavaju cistein i s peptidima koji sadržavaju lizin, trebalo bi smatrati da je analiza „bez jasnih rezultata”. Ako se koelucija pojavljuje samo s peptidima koji sadržavaju lizin, može se upotrijebiti model predviđanja s cisteinom 1:10, koji je naveden u tablici 2.

Tablica 2.

Model predviđanja s cisteinom 1:10 ([1])

Postotak potrošnje cisteina (Cys)	Razred reaktivnosti	Predviđanje na temelju metode DPRA ([2])
0 % ≤ postotak potrošnje cisteina ≤ 13,89 %	Nepostojeća ili minimalna reaktivnost	Negativno
13,89 % < postotak potrošnje cisteina ≤ 23,09 %	Niska reaktivnost	Pozitivno
23,09 % < postotak potrošnje cisteina ≤ 98,24 %	Umjerena reaktivnost	
98,24 % < postotak potrošnje cisteina ≤ 100 %	Visoka reaktivnost	

([1]) Brojevi se odnose na statistički dobivene granične vrijednosti i nisu povezani s preciznošću mjerenja.
([2]) Predviđanje na temelju metode DPRA trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 9. i 12.

Mogu isto tako postojati slučajevi u kojima se vrijeme zadržavanja ispitivane kemikalije i vrijeme zadržavanja jednog od peptida ne preklapaju u cijelosti. U takvim se slučajevima postotci potrošnje peptida mogu procijeniti i upotrijebiti u modelu predviđanja s cisteinom 1:10 / lizinom 1:50, ali ispitivanu kemikaliju nije moguće precizno razvrstati u razred reaktivnosti.

▼M7

Za ispitivanu kemikaliju trebala bi biti dovoljna jedna analiza HPLC-om za peptid koji sadržava cistein i peptid koji sadržava lizin ako se njome dobije jasan rezultat. Međutim, u slučajevima rezultata koji su blizu praga koji se upotrebljava za razlikovanje pozitivnih i negativnih rezultata (tj. graničnih rezultata) mogu biti potrebna dodatna ispitivanja. Ako je srednja vrijednost postotka potrošnje u rasponu od 3 % do 10 % za model predviđanja s cisteinom 1:10 / lizinom 1:50 ili ako je postotak potrošnje cisteina u rasponu od 9 % do 17 % za model predviđanja s cisteinom 1:10, trebalo bi razmotriti provođenje još jedne analize, a potom i treće ako se prvim dvjema analizama dobiju nesukladni rezultati.

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

— jednokomponentna tvar

  — kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

  — fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

  — čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

  — obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

  — ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

  — uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

— višekomponentna tvar, UVCB tvar i smjesa:

  — opisana koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

  — fizički izgled, topljivost u vodi te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

  — molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje istraživanja,

  — obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

  — ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

  — uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Kontrole

— pozitivna kontrola

  — kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

  — fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

  — čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

▼M7

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— upućivanje na podatke koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju prikladnost kriterija prihvatljivosti analitičke serije, ako je primjenjivo.

— Otapalo/nosač

— upotrijebljeno otapalo/nosač te omjer njegovih sastojaka, ako je primjenjivo,

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljena otapala/nosači koji nisu navedeni u ispitnoj metodi, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju,

— za acetonitril, rezultati ispitivanja utjecaja na stabilnost peptida.

Priprema peptida, pozitivna kontrola i ispitivana kemikalija

— opis svojstava otopina peptida (dobavljač, serija, točna masa peptida, volumen dodan za pripremu radne otopine),

— opis svojstava otopine koja sadržava pozitivnu kontrolu (točna masa tvari koja se upotrebljava za pozitivnu kontrolu, volumen dodan za pripremu ispitne otopine),

— opis svojstava otopina ispitivane kemikalije (točna masa ispitivane kemikalije, volumen dodan za pripremu ispitne otopine).

Postavke uređaja i analize HPLC-om

— vrsta uređaja za HPLC, kolona za HPLC i pretkolona, detektor, automatski dodavač uzoraka,

— parametri relevantni za analizu HPLC-om, kao što su temperatura kolone, ubrizgavani volumeni, brzina protoka i gradijent.

Prikladnost sustava

— površina pika peptida na 220 nm za svaki standard i svaki ponovljeni uzorak referentne kontrole A,

— grafički prikaz linearne kalibracijske krivulje te iznos koeficijenta r^2,

— koncentracija peptida za svaki ponovljeni uzorak referentne kontrole A,

— srednja vrijednost koncentracije peptida (mM) za tri referentne kontrole A, SD i CV,

— koncentracija peptida za referentne kontrole A i C.

▼M7

Analitički ciklus

— za referentne kontrole:

  — površina pika peptida na 220 nm za svaki ponovljeni uzorak B i C,

  — srednja vrijednost površine pika peptida na 220 nm za devet referentnih kontrola B i C u acetonitrilu te SD i CV (za stabilnost referentnih kontrola za vrijeme trajanja analize),

  — za svako upotrijebljeno otapalo, srednja vrijednost površine pika peptida na 220 nm za tri odgovarajuće referentne kontrole C (za izračunavanje postotka potrošnje peptida),

  — za svako upotrijebljeno otapalo, koncentracija peptida (mM) za tri odgovarajuće referentne kontrole C,

  — za svako upotrijebljeno otapalo, srednja vrijednost koncentracije peptida (mM) za tri odgovarajuće referentne kontrole C, SD i CV;

— za pozitivnu kontrolu:

  — površina pika peptida na 220 nm za svako ponavljanje,

  — postotak potrošnje peptida za svaki ponovljeni uzorak,

  — srednja vrijednost postotka potrošnje peptida za tri ponovljena uzorka, SD i CV;

— za svaku ispitivanu kemikaliju:

  — pojava precipitacije u reakcijskoj smjesi na kraju razdoblja inkubacije, ako je zapažena. Navesti je li precipitat ponovno otopljen ili centrifugiran,

  — prisutnost koelucije,

  — opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo,

  — površina pika peptida na 220 nm za svaki ponovljeni uzorak,

  — postotak potrošnje peptida za svaki ponovljeni uzorak,

  — srednja vrijednost postotka potrošnje peptida za tri ponovljena uzorka, SD i CV,

  — srednja vrijednost postotka potrošnje cisteina i postotka potrošnje lizina,

  — upotrijebljeni model predviđanja te predviđanje na temelju metode DPRA.

Ispitivanje osposobljenosti

— Ako je primjenjivo, postupak koji se koristi za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tijekom vremena.

Rasprava o rezultatima

— rasprava o rezultatima dobivenima ispitnom metodom DPRA,

— rasprava o rezultatima ispitne metode u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključak

▼M7

LITERATURA

1. United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

3. Poglavlje B.6. ovog Priloga: Senzibilizacija kože.

4. Poglavlje B.42. ovog Priloga: Analiza lokalnih limfnih čvorova

5. Poglavlje B.50. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: Analiza lokalnih limfnih čvorova: DA.

6. Poglavlje B.51. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: Analiza lokalnih limfnih čvorova BrdU-ELISA

7. Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367–485.

8. Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332–343.

9. Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417–427.

10. EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

11. Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, objavljeno na internetu 14. svibnja 2013., DOI: 10.1002/jat.2869.

12. Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489–504.

13. Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

14. Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389–400.

15. Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625–639.

16. Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

17. Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

18. EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Dostupno na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

19. Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, objavljeno na internetu 9. travnja 2013., DOI:10.1002/jat.2868.

20. DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Dostupno na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

21. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

22. FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Dostupno na: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

23. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti”. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (21.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (2.).

Kalibracijska krivulja: odnos između vrijednosti odgovora dobivenog u pokusu i analitičke koncentracije (naziva se i *standardna krivulja*) poznate tvari.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Koeficijent varijacije: mjera varijabilnosti koja se za skupinu podataka dobivenih od ponovljenih uzoraka izračunava dijeljenjem standardnog odstupanja sa srednjom vrijednošću. Može se pomnožiti sa 100 da bi se izrazila u obliku postotka.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

Početni molekularni događaj: poremećaj biološkog sustava na razini molekule koji je izazvala kemikalija, a koji je identificiran kao početni događaj u nastanku štetnog ishoda.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari koje u njoj ne reagiraju (1.).

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

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

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

Referentna kontrola: netretirani uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila

▼M7

polazna reakcija za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom negativnom kontrolom, taj uzorak pokazuje i jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (sukladnosti) ispitne metode (21).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (21).

Obnovljivost: podudarnost rezultata dobivenih ispitivanjem iste kemikalije uz primjenu istog ispitnog protokola (vidjeti „pouzdanost”) (21.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (21.).

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (21.).

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava (1.).

Prikladnost sustava: određivanje radnih značajki uređaja (npr. osjetljivosti) analiziranjem referentnog standarda prije izvođenja testa na analitičkoj šarži (22.).

Ispitivana kemikalija: izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava se za označivanje onoga što se ispituje.

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

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

Valjana ispitna metoda: ispitna metoda za koju se smatra da je dovoljno relevantna i pouzdana za određenu svrhu te koja se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitna metoda nije nikada valjana u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (21.).

▼M7

Dodatak 2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Izazivanje preosjetljivosti kože *in chemico:* test izravne reaktivnosti peptida

Prije rutinske primjene ove ispitne metode laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari koje su u tablici 1. preporučene za dokazivanje osposobljenosti dobiti očekivano predviđanje na temelju metode DPRA te za osam od deset tvari preporučenih za dokazivanje osposobljenosti za svaki peptid dobiti vrijednosti potrošnje cisteina i lizina koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Drugi kriteriji za odabir bili su da tvari budu komercijalno dostupne, da su dostupni visokokvalitetni referentni podaci dobiveni *in vivo* i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni metodom DPRA te da su tvari upotrijebljene u validacijskoj studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM za dokazivanje uspješne primjene ispitne metode u laboratorijima koji su sudjelovali u studiji.

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa izravne reaktivnosti peptida

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Fizikalno stanje	Predviđanje *in vivo* ([1])	Predviđanje na temelju metode DPRA ([2])	Raspon ([3]) postotka potrošnje peptida koji sadržava cistein	Raspon ([3]) postotka potrošnje peptida koji sadržava lizin
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Tvari koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	90-100	15-45
Oksazolon	15646-46-5	Kruta tvar	Tvari koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	60-80	10-55
Formaldehid	50-00-0	Tekućina	Tvari koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	30-60	0-24
Benziliden aceton	122-57-6	Kruta tvar	Tvari koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	80-100	0-7
Farnezal	19317-11-4	Tekućina	Tvari koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	15-55	0-25
2,3-butandion	431-03-8	Tekućina	Tvari koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	60-100	10-45
1-butanol	71-36-3	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	0-7	0-5.5
6-metilkumarin	92-48-8	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	0-7	0-5.5
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	0-7	0-5.5
4-metoksiacetofenon	100-06-1	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	0-7	0-5.5

([1]) Predviđanja opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelje se na podacima dobivenima s pomoću metode LLNA (19.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (23.).

([2]) Predviđanje na temelju metode DPRA trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 9. i 11.

([3]) Rasponi određeni na temelju najmanje deset vrijednosti potrošnje dobivenih u šest neovisnih laboratorija.

▼M7

Dodatak 3.

PRIMJERI ANALITIČKOG CIKLUSA

Kalibracijski standardi i referentne kontrole	Standard 1. Standard 2. Standard 3. Standard 4. Standard 5. Standard 6. Pufer za razrjeđivanje Referentna kontrola A, ponov. uz. 1. Referentna kontrola A, ponov. uz. 2. Referentna kontrola A, ponov. uz. 3.
Kontrole koelucije	1. kontrola koelucije za ispitivanu kemikaliju 1. 2. kontrola koelucije za ispitivanu kemikaliju 2.
Referentne kontrole	Referentna kontrola B, ponov. uz. 1. Referentna kontrola B, ponov. uz. 2. Referentna kontrola B, ponov. uz. 3.
Prva serija ponovljenih uzoraka	Referentna kontrola C, ponov. uz. 1. Cimetni aldehid, ponov. uz. 1. Uzorak 1., ponov. uz. 1. Uzorak 2., ponov. uz. 1.
Druga serija ponovljenih uzoraka	Referentna kontrola C, ponov. uz. 2. Cimetni aldehid, ponov. uz. 2. Uzorak 1., ponov. uz. 2. Uzorak 2., ponov. uz. 2.
Treća serija ponovljenih uzoraka	Referentna kontrola C, ponov. uz. 3. Cimetni aldehid, ponov. uz. 3. Uzorak 1., ponov. uz. 3. Uzorak 2., ponov. uz. 3.
Referentne kontrole	Referentna kontrola B, ponov. uz. 4. Referentna kontrola B, ponov. uz. 5. Referentna kontrola B, ponov. uz. 6.

U analitički ciklus trebalo bi uključiti tri serije referentnih kontrola (tj. uzoraka koji se sastoje samo od peptida otopljenog u odgovarajućem otapalu):
referentna kontrola A: upotrebljava se za provjeravanje prikladnosti sustava HPLC,
referentna kontrola B: uključuje se na početku i na kraju analitičkog ciklusa kako bi se provjerila stabilnost referentnih kontrola za vrijeme trajanja analize
referentna kontrola C: uključuje se u analitički ciklus kako bi se provjerilo da otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije ne utječe na postotak potrošnje peptida.

▼M7

B.60. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO:* TEST LUCIFERAZE ARE-NRF2

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 442D (2015.). Tvar koja izaziva preosjetljivost kože tvar je koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definirana u Globalno usklađenom sustavu Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EZ) 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u) ([1]). U ovoj se ispitnoj metodi opisuje postupak *in vitro* (test luciferaze ARE-Nrf2) koji treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sustavom UN GHS (1.) i Uredbom o CLP-u.

Postoji opća suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o kemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažeto su prikazane u obliku puta nastanka štetnog ishoda (AOP) (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do štetnog učinka na zdravlje, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa u ljudi ili kontaktne preosjetljivosti u glodavaca (2., 3.). Početni molekularni događaj jest stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih tvari i nukleofilnih središta u bjelančevinama kože. Drugi se ključni događaj u tom AOP-u odvija u keratinocitima i uključuje upalne odgovore te gensku ekspresiju povezanu sa specifičnim staničnim signalnim putovima poput putova koji ovise o elementu antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/ electrophile response element*, ARE). Treći je ključni događaj aktiviranje dendritičnih stanica, koje se obično ocjenjuje prema ekspresiji specifičnih staničnih površinskih biljega, kemokina i citokina. Četvrti je ključni događaj proliferacija T-stanica, koja se neizravno ocjenjuje analizom lokalnih limfnih čvorova na miševima (4.).

U procjenama preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (5.)), ispituje se i faza indukcije i faza elicitacije preosjetljivosti kože. Ispitivanja na miševima, tj. analiza lokalnih limfnih čvorova (LLNA) (ispitna metoda B.42. (4.)) i njezine dvije inačice u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izotopi, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (6.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (7.)), pri čemu se svima trima ispituje isključivo odgovor u fazi indukcije, isto tako su prihvaćena jer predstavljaju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja i objektivnog mjerenja faze indukcije preosjetljivosti kože.

U novije se vrijeme *in chemico* i *in vitro* ispitne metode koje se temelje na mehanističkom pristupu smatraju znanstveno valjanima za ocjenjivanje opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože povezanih s kemikalijama. Međutim, potrebne su kombinacije metoda koje ne uključuju ispitivanja na životinjama (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (IATA), kako bi se mogla u cijelosti zamijeniti ispitivanja na životinjama koja su trenutačno u upotrebi, s obzirom na ograničenu mehanističku domenu AOP-a svake od trenutačno dostupnih ispitnih metoda koje ne uključuju ispitivanja na životinjama (2., 3.).

Ova se ispitna metoda (test luciferaze ARE-Nrf2) predlaže za ispitivanje drugog ključnog događaja kako je objašnjeno u stavku 2. Postoje izvješća o tome da tvari koje izazivaju preosjetljivost kože induciraju gene koje regulira element antioksidacijskog odgovora (ARE) (8., 9.). Male elektrofilne tvari poput tvari koje izazivaju preosjetljivost kože mogu djelovati na senzorski protein Keap1

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

▼M7

(*Kelch-like ECH-associated protein 1*), npr. kovalentnom modifikacijom njegovog cisteinskog ostatka, uzrokujući time njegovu disocijaciju od transkripcijskog faktora Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Disocirani Nrf2 može potom aktivirati gene koji ovise o ARE-u, kao što su geni koji kodiraju detoksificirajuće enzime faze II. (8., 10., 11.).

Ovom je ispitnom metodom trenutačno obuhvaćena samo jedna *in vitro* metoda ispitivanja luciferaze ARE-Nrf2, a to je test KeratinoSens™ za koji su provedene validacijske studije (9., 12., 13.) te potom neovisan stručni pregled koji je izvršio Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) (14.). Ocijenjeno je da je test KeratinoSens™ znanstveno valjan za primjenu u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, a u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti (14.). Laboratoriji koji žele primijeniti ispitnu metodu mogu dobiti rekombinantnu staničnu liniju koja se upotrebljava u testu KeratinoSens™ sklapanjem sporazuma o licenciji sa subjektom koji je razvio ispitnu metodu (15.).

Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA, PRIMJENJIVOST I OGRANIČENJA

S obzirom na to da se aktivacija puta Keap1-Nrf2-ARE odnosi isključivo na drugi ključni događaj u AOP-u preosjetljivosti kože, informacije dobivene ispitnim metodama koje se temelje na aktivaciji tog puta možda same po sebi neće biti dovoljne za donošenje zaključka o potencijalu kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga bi podatke dobivene ovom ispitnom metodom trebalo razmatrati u kontekstu integriranih pristupa poput IATA-e te ih kombinirati s ostalim dodatnim informacijama, npr. onima dobivenima *in vitro* pokusima kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s kemijski analognim tvarima. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe testa luciferaze ARE-Nrf2 u kombinaciji s ostalim informacijama (13., 16., 17., 18., 19.).

Ova se ispitna metoda može upotrijebiti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. onih koje su razvrstane u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, u kontekstu IATA-e. Ova se ispitna metoda ne može upotrijebiti kao jedina metoda za razvrstavanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definirane u sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, ovisno o regulatornom okviru pozitivan se rezultat može samostalno upotrijebiti za razvrstavanje kemikalije u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u.

Skup podataka iz validacijske studije i podataka dobivenih internim ispitivanjem provedenim za potrebe neovisnog stručnog pregleda ispitne metode dokazuje da se test KeratinoSens™ može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva u uzgoju stanica. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ove ispitne metode unutarlaboratorijska i međulaboratorijska obnovljivost biti reda veličine 85 % (14.). Točnost (77 % – 155/201), osjetljivost (78 % – 71/91) i specifičnost (76 % – 84/110) testa KeratinoSens™ za razlikovanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. onih koje su razvrstane u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, u usporedbi s rezultatima dobivenima metodom LLNA, izračunati su uzimajući u obzir sve podatke koji su dostavljeni EURL ECVAM-u za potrebe ocjenjivanja i stručnog pregleda ispitne metode (14.). Te su brojke slične onima koje su nedavno objavljene na temelju internog ispitivanja oko 145 tvari (točnost od 77 %, osjetljivost od 79 %, specifičnost od 72 %) (13.). Veća je vjerojatnost da će se testom KeratinoSens™ podcijeniti kemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B sustava

▼M7

UN GHS / prema Uredbi o CLP-u) nego što će se podcijeniti kemikalije koje pokazuju visoku jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A sustava UN GHS / prema Uredbi o CLP-u) (13., 14.). Prethodno navedene informacije upućuju na to da se testom KeratinoSens™ može korisno pridonijeti identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost testa KeratinoSens™ kao samostalne ispitne metode samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama prethodnog stavka 9. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da metoda LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod vrste za koju se žele dobiti rezultati, tj. ljudi.

U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost testa luciferaze ARE-Nrf2 za ispitivanje tvari i/ili smjesa. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se test KeratinoSens™ može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (9., 12., 13., 14.). Uglavnom su ispitane jednokomponentne tvari, iako postoji ograničena količina podataka i o ispitivanju smjesa (20.). Unatoč tomu, ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje višekomponentnih tvari i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Osim toga, kada se ispituju višekomponentne tvari ili smjese, trebalo bi razmotriti moguću interferenciju citotoksične komponente sa zapaženim odgovorima. Ova se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje kemikalija koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala stvarajući različite faze) u vodi ili DMSO-u (ovo vrijedi za sve komponente ispitivane kemikalije u slučaju ispitivanja višekomponentne tvari ili smjese). Ispitivane kemikalije koje ne ispunjuju te uvjete pri najvišoj potrebnoj konačnoj koncentraciji od 2 000 µM (vidjeti stavak 22.) mogu se ispitati i pri nižim koncentracijama. U tom se slučaju rezultati koji ispunjuju kriterije pozitivnosti opisane u stavku 39. mogu ipak upotrijebiti kao potpora identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja izaziva preosjetljivost kože, dok bi negativan rezultat dobiven s koncentracijama manjima od 1 000 µM trebalo smatrati nejasnim (vidjeti model predviđanja u stavku 39.). Općenito, uspješno su ispitane tvari kod kojih vrijednost LogP iznosi 5 ili manje, dok se krajnje hidrofobne tvari čija je vrijednost LogP veća od 7 nalaze izvan poznatih granica primjenjivosti ispitne metode (14). Za tvari kod kojih je vrijednost LogP između 5 i 7 dostupne su samo ograničene informacije.

Negativne rezultate trebalo bi tumačiti s oprezom jer se tvari koje su reaktivne isključivo na lizinski ostatak mogu ovom metodom identificirati kao negativne. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti upotrijebljene stanične linije (21.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. kemikalije koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer preko enzima P450) i prehapteni (tj. kemikalije koje se aktiviraju autooksidacijom), posebno oni sa sporom oksidacijom, mogu isto tako dati negativne rezultate. S druge strane, ispitivane kemikalije koje ne izazivaju preosjetljivost, ali ipak uzrokuju kemijski stres, mogu dati lažno pozitivne rezultate (14). Nadalje, ispitivane kemikalije koje su vrlo citotoksične ne mogu se uvijek pouzdano ocijeniti. Konačno, ispitivane kemikalije koje utječu na enzim luciferazu mogu remetiti aktivnost luciferaze u staničnim analizama uzrokujući prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju (22.). Na primjer, postoje izvješća

▼M7

o tome da su koncentracije fitoestrogena veće od 1 μM u drugim luciferaznim testovima utjecale na signale luminiscencije zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (23.). Stoga je potrebno pažljivo ispitati ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih kemikalija za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (23.). U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija kemikalija, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije kemikalija.

Osim što pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože, testom KeratinoSens™ isto se tako dobivaju informacije o odnosu koncentracije i odgovora koje bi mogle pridonijeti procjeni jakosti izazivanja preosjetljivosti u okviru integriranih pristupa poput IATA-e (19.). Međutim, da bi se moglo utvrditi na koji način rezultati dobiveni testom KeratinoSens™ mogu pridonijeti procjeni jakosti (24.) te razvrstavanju tvari koje izazivaju preosjetljivost u potkategorije prema sustavu UN GHS / Uredbi o CLP-u, potreban je dodatan rad koji će se po mogućnosti temeljiti na pouzdanim podacima dobivenim na ljudima.

NAČELO ISPITIVANJA

U testu luciferaze ARE-Nrf2 upotrebljava se imortalizirana adherentna stanična linija dobivena iz ljudskih keratinocita HaCaT stabilno transficiranih selektibilnim plazmidom. Stanična linija sadržava gen luciferaze pod transkripcijskom kontrolom konstitutivnog promotora vezanog na element ARE gena za koji je poznato da mu se ekspresija pojačava pod utjecajem kontaktnih senzibilizatora (25., 26.). Signal luciferaze odražava aktivaciju endogenih gena ovisnih o faktoru Nrf2 koju izazivaju senzibilizatori, a dokazano je da signal luciferaze u rekombinantnoj staničnoj liniji ovisi o faktoru Nrf2 (27.). To omogućuje kvantitativno mjerenje (otkrivanjem luminiscencije) indukcije gena luciferaze, uporabom supstrata luciferaze za koje je poznato da stvaraju svjetlost, kao pokazatelja aktivnosti transkripcijskog faktora Nrf2 u stanicama nakon izlaganja elektrofilnim tvarima.

U testu KeratinoSens™ ispitivane se kemikalije smatraju pozitivnima ako izazivaju statistički značajnu indukciju aktivnosti luciferaze iznad utvrđenog praga (tj. > pomnoženo s 1,5 ili povećanje od 50 %), ispod određene koncentracije koja ne utječe znatno na sposobnost preživljavanja stanica (tj. ispod 1 000 μM te pri koncentraciji pri kojoj je preživljavanje stanica veće od 70 % (9., 12.)). U tu se svrhu utvrđuje maksimalan multiplikacijski faktor (I_{max}) za indukciju aktivnosti luciferaze u odnosu na (negativnu) kontrolu s otapalom. Nadalje, s obzirom na to da se stanice izlaže nizu koncentracija ispitivanih kemikalija, koncentraciju potrebnu za statistički značajnu indukciju aktivnosti luciferaze iznad praga (tj. vrijednost $EC_{1,5}$) trebalo bi interpolirati iz krivulje doza – odgovor (za izračune vidjeti stavak 32.). Konačno, trebalo bi provesti paralelna mjerenja citotoksičnosti kako bi se procijenilo dolazi li do indukcije aktivnosti luciferaze pri subcitotoksičnim koncentracijama.

Prije rutinske primjene testa luciferaze ARE-Nrf2 koji je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost izvodeći test na deset tvari navedenih u Dodatku 2. koje služe za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

Utvrđene su norme za djelovanje (28.) kako bi olakšale validaciju novih ili modificiranih *in vitro* testova luciferaze ARE-Nrf2 koji su slični testu KeratinoSens™ te omogućile pravodobnu izmjenu ove ispitne metode radi njihova uključenja u nju. Uzajamno prihvaćanje podataka na temelju sporazuma OECD-a jamči se samo za ispitne metode koje su validirane u skladu sa standardima djelovanja ako je OECD pregledao te ispitne metode i uključio ih u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

▼M7

POSTUPAK

Ovom je ispitnom metodom trenutačno obuhvaćen samo znanstveno valjani test KeratinoSens™ (9., 12., 13., 14). Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za test KeratinoSens™ te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi i primjeni ispitne metode u laboratoriju (15.). Laboratoriji koji žele primijeniti ispitnu metodu mogu dobiti rekombinantnu staničnu liniju koja se upotrebljava u testu KeratinoSens™ sklapanjem sporazuma o licenciji sa subjektom koji je razvio ispitnu metodu. U sljedećim se stavcima navodi opis glavnih komponenata i postupaka testa luciferaze ARE-Nrf2.

Priprema kultura keratinocita

Trebalo bi upotrijebiti transgeničnu staničnu liniju koja ima stabilnu inserciju reporterskog gena za luciferazu pod kontrolom elementa ARE (npr. staničnu liniju KeratinoSens™). Nakon primitka stanice se razmnožavaju (npr. 2 do 4 pasaža) te čuvaju zamrznute kao homogena zaliha. Stanice iz izvorne zalihe mogu se razmnožiti do maksimalnog broja pasaža (npr. 25 u slučaju testa KeratinoSens™) te se upotrebljavaju za rutinsko ispitivanje koristeći se pritom odgovarajućim medijem za održavanje (u slučaju testa KeratinoSens™ to je DMEM koji sadržava serum i geneticin).

Za ispitivanje, stanice bi trebale biti 80 – 90 % konfluentne te bi trebalo paziti da nikada ne dosegnu punu konfluenciju. Dan prije ispitivanja stanice se izdvajaju i raspoređuju na pločice s 96 jažica (10 000 stanica po jažici u slučaju testa KeratinoSens™). Potrebno je paziti da se izbjegne taloženje stanica tijekom nasađivanja kako bi se osigurala homogena distribucija broja stanica među jažicama. Ako to nije slučaj, ova faza može izazvati veliku varijabilnost među jažicama. Za svako ponavljanje upotrebljavaju se tri ponovljena uzorka za mjerenje aktivnosti luciferaze te jedan paralelni ponovljeni uzorak za ispitivanje sposobnosti preživljavanja stanica.

Priprema ispitivane kemikalije i tvari koje služe kao kontrola

Ispitivana kemikalija i tvari koje služe kao kontrola pripremaju se na dan ispitivanja. Za test KeratinoSens™ ispitivane kemikalije otapaju se u dimetil sulfoksidu (DMSO) do konačne željene koncentracije (npr. 200 mM). Otopine DMSO-a mogu se smatrati samosterilizirajućima te nije potrebna sterilna filtracija. Ispitivana kemikalija koja nije topljiva u DMSO-u otapa se u sterilnoj vodi ili hranjivoj podlozi za uzgoj kulture i otopine se steriliziraju, npr. filtriranjem. Za ispitivanu kemikaliju koja nema utvrđenu molekularnu masu (MM) priprema se radna otopina do zadane koncentracije (40 mg/mL ili 4 % (w/v)) u testu KeratinoSens™. Ako se upotrebljavaju druga otapala, a ne DMSO, voda ili hranjiva podloga za uzgoj kulture, potrebno je navesti dovoljno znanstveno obrazloženje.

Od radnih otopina ispitivane kemikalije u DMSO-u pripremaju se serijska razrjeđenja s pomoću DMSO-a kako bi se dobilo 12 glavnih koncentracija kemikalije koje će se ispitivati (od 0,098 do 200 mM u testu KeratinoSens™). Za ispitivanu kemikaliju koja nije topljiva u DMSO-u razrjeđenja za dobivanje glavnih koncentracija pripremaju se s pomoću sterilne vode ili sterilne hranjive podloge za uzgoj kulture. Neovisno o upotrijebljenom otapalu glavne se koncentracije potom razrjeđuju dvadesetpeterostruko u hranjivoj podlozi za uzgoj kulture koja sadržava serum te se na kraju upotrebljavaju za tretiranje nakon još jednog četverostrukog razrjeđivanja tako da konačne koncentracije ispitivane kemikalije budu u rasponu od 0,98 do 2 000 μM u testu KeratinoSens™. U opravdanim je slučajevima moguće upotrijebiti druge koncentracije (npr. u slučaju citotoksičnosti ili slabe topljivosti).

U testu KeratinoSens™ kao negativna kontrola (s otapalom) upotrebljava se DMSO (CAS br. 67-68-5, čistoće ≥ 99 %), za koju se priprema šest jažica po pločici. Razrjeđuje se na isti način kako je opisano za glavne koncentracije u stavku 22., tako da konačna koncentracija negativne kontrole (s otapalom) bude 1 %, za koju je poznato da ne utječe na preživljavanje stanica te odgovara istoj

▼M7

koncentraciji DMSO-a u ispitanoj kemikaliji i pozitivnoj kontroli. Za ispitivanu kemikaliju koja nije topljiva u DMSO-u i za koju su razrjeđenja pripremljena u vodi, koncentracija DMSO-a u svim jažicama konačne ispitne otopine mora se prilagoditi tako da iznosi 1 % kao i kod drugih ispitivanih kemikalija i tvari koje služe kao kontrola.

U testu KeratinoSens™ kao pozitivna kontrola upotrebljava se cimetni aldehid (CAS br. 14371-10-9, čistoće ≥ 98 %) te se za nju priprema serija od pet glavnih koncentracija u rasponu od 0,4 do 6,4 mM u DMSO-u (od radne otopine od 6,4 mM), koje se razrjeđuju kako je opisano za glavne koncentracije u stavku 22. tako da konačna koncentracija pozitivne kontrole bude u rasponu od 4 do 64 μM. Mogu se upotrijebiti i druge prikladne pozitivne kontrole koje po mogućnosti daju srednje vrijednosti $EC_{1,5}$, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti za analitičku seriju.

Primjena ispitivane kemikalije i tvari koje služe kao kontrola

Za svaku ispitivanu kemikaliju i tvar koja se upotrebljava za pozitivnu kontrolu potreban je jedan pokus za izvođenje predviđanja (pozitivnog ili negativnog), koji se sastoji od najmanje dva neovisna ponavljanja od kojih svako sadržava tri ponovljena uzorka (tj. n = 6). Ako se dvama neovisnim ponavljanjima dobiju nesukladni rezultati, trebalo bi provesti treće ponavljanje s tri ponovljena uzorka (tj. n = 9). Neovisna se ponavljanja provode u različite dane svaki put sa svježom radnom otopinom ispitivanih kemikalija i neovisno izdvojenim stanicama. Međutim, stanice mogu biti iz iste pasaže.

Nakon što se nasade kako je opisano u stavku 20., stanice se uzgajaju 24 sata na mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica. Medij se potom uklanja i zamjenjuje svježom hranjivom podlogom za uzgoj kulture (150 μl hranjive podloge za uzgoj kulture koja sadržava serum, ali bez geneticina u slučaju testa KeratinoSens™) u koju se dodaje 50 μl dvadesetpeterostruko razrijeđene ispitivane kemikalije i tvari koje služe za kontrolu. Najmanje jednu jažicu po pločici trebalo bi ostaviti praznu (bez stanica i tretiranja) radi određivanja osnovnih vrijednosti.

Tretirane se pločice potom inkubiraju oko 48 sati na 37 ± 1 °C u prisutnosti 5 % CO_2 u testu KeratinoSens™. Potrebno je paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. pokrivanjem pločica metalnom folijom prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama.

Mjerenja aktivnosti luciferaze

Tri su faktora ključna za osiguranje pravilnih očitavanja luminiscencije:

— odabir osjetljivog luminometra,

— upotreba formata pločice dovoljne visine da se izbjegne unakrsna kontaminacija svjetlom i

— upotreba supstrata luciferaze koji emitira dovoljno svjetlosti da osigura dovoljnu osjetljivost i nisku varijabilnost.

Prije ispitivanja trebalo bi provesti kontrolni pokus kako je opisano u Dodatku 3. kako bi se osiguralo ispunjavanje tih triju zahtjeva.

Nakon 48 sati izlaganja ispitivanoj kemikaliji i tvarima koje služe za kontrolu u testu KeratinoSens™ stanice se ispiru fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom te se u svaku jažicu doda odgovarajući lizni pufer za očitavanje luminiscencije i ostavi 20 minuta na sobnoj temperaturi.

▼M7

Potom se pločice koje sadržavaju stanični lizat radi očitavanja stavljaju u luminometar koji je u testu KeratinoSens™ programiran tako da: i. u svaku jažicu dodaje supstrat luciferaze (tj. 50 µl), ii. čeka jednu sekundu te iii. integrira aktivnost luciferaze dvije sekunde. Ako se upotrebljavaju drukčiji parametri, npr. ovisno o modelu luminometra, potrebno ih je obrazložiti. Nadalje, može se upotrijebiti i tinjavi supstrat pod uvjetom da je pokus za kontrolu kvalitete iz Dodatka 3. uspješno izveden.

Procjena citotoksičnosti

Za test preživljavanja stanica KeratinoSens™ medij se nakon 48 sati izlaganja zamjenjuje svježim medijem koji sadržava MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavi tetrazolijev bromid; CAS br. 298-93-1) te se stanice inkubiraju četiri sata na 37 °C u prisutnosti 5 % CO_2. Potom se medij MTT uklanja i stanice se tijekom noći liziraju (npr. dodavanjem 10 %-tne otopine SDS-a u svaku jažicu). Nakon protresanja fotometrom se mjeri apsorpcija na 600 nm.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

U testu KeratinoSens™ izračunavaju se sljedeći parametri:

— najveći prosječni multiplikacijski faktor indukcije aktivnosti luciferaze (I_{max}) za svaku koncentraciju ispitane kemikalije i pozitivne kontrole,

— vrijednost $EC_{1,5}$ koja predstavlja koncentraciju za koju je dobivena indukcija aktivnosti luciferaze iznad praga koji odgovara povećanju pomnoženom s 1,5 (tj. povećanju aktivnosti luciferaze od 50 %) i

— vrijednosti koncentracije IC_{50} i IC_{30} koje odgovaraju smanjenju preživljavanja stanica od 50 % i 30 %.

— multiplikacijski faktor indukcije aktivnosti luciferaze izračunava se s pomoću jednadžbe 1., a ukupni maksimalni multiplikacijski faktor indukcije (I_{max}) izračunava se kao prosjek pojedinačnih ponavljanja.

Jednadžba 1.:

$$Multiplikacijski\ faktor\ indukcije = \frac{(L_{uzorak} - L_{prazno})}{(L_{otapalo} - L_{prazno})}$$

pri čemu je:

L_{uzorak}= luminiscencija izmjerena u jažici koja sadržava ispitivanu kemikaliju

L_{prazno}= luminiscencija izmjerena u praznoj jažici koja ne sadržava stanice i nije tretirana

$L_{otapalo}$ = prosječna vrijednost luminiscencije izmjerene u jažicama koje sadržavaju stanice i negativnu kontrolu (s otapalom)

$EC_{1,5}$ se izračunava linearnom interpolacijom s pomoću jednadžbe 2., a ukupan $EC_{1,5}$ izračunava se kao geometrijska sredina pojedinačnih ponavljanja.

Jednadžba 2.:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

pri čemu je:

C_a = najniža koncentracija u μM pri kojoj je povećanje indukcije > 1,5 puta

C_b = najviša koncentracija u μM pri kojoj je povećanje indukcije < 1,5 puta

I_a = multiplikacijski faktor indukcije izmjerene pri najnižoj koncentraciji pri kojoj je povećanje indukcije > 1,5 puta (srednja vrijednost za tri jažice kao ponovljeni uzorak)

I_b = multiplikacijski faktor indukcije izmjerene pri najvišoj koncentraciji pri kojoj je povećanje indukcije > 1,5 puta (srednja vrijednost za tri jažice kao ponovljeni uzorak)

Preživljavanje se izračunava s pomoću jednadžbe 3.:

jednadžba 3.:

$$Preživljavanje = \frac{(V_{uzorak} - V_{prazno})}{V_{otapalo} - V_{prazno}} \times 100$$

pri čemu je:

V_{uzorak} = apsorbancija izmjerena testom MTT u jažici koja sadržava ispitivanu kemikaliju

V_{prazno} = apsorbancija izmjerena testom MTT u praznoj jažici koja ne sadržava stanice i nije tretirana

$V_{otapalo}$ = prosječna apsorbancija izmjerena testom MTT u jažicama koje sadržavaju stanice i negativnu kontrolu (s otapalom)

IC_{50} i IC_{30} izračunavaju se linearnom interpolacijom s pomoću jednadžbe 4., a ukupni IC_{50} i IC_{30} izračunavaju se kao geometrijska sredina pojedinačnih ponavljanja.

Jednadžba 4.:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha} \right) + C_\alpha$$

pri čemu je:

X = smanjenje od % pri koncentraciji koju treba izračunati (50 i 30 za IC_{50} i IC_{30})

C_a = najniža koncentracija u μM za koju je smanjenje preživljavanja > x %

C_b = najviša koncentracija u μM za koju je smanjenje preživljavanja > x %

V_a = preživljavanje od % pri najnižoj koncentraciji za koju je smanjenje preživljavanja > x %

V_b = preživljavanje od % pri najvišoj koncentraciji za koju je smanjenje preživljavanja < x %

Za svaku se koncentraciju koja pokazuje povećanje indukcije aktivnosti luciferaze > 1,5 puta izračunava statistička značajnost (npr. dvosmjernim Studentovim t-testom) uspoređivanjem vrijednosti luminiscencije za tri ponovljena uzorka s vrijednostima luminiscencije u jažicama koje sadržavaju (negativnu) kontrolu s otapalom kako bi se utvrdilo je li indukcija aktivnosti luciferaze statistički značajna ($p < 0,05$). Najniža koncentracija pri kojoj je povećanje indukcije aktivnosti luciferaze > 1,5 puta vrijednost je koja određuje $EC_{1,5}$. U svakom se slučaju provjerava je li ta vrijednost niža od vrijednosti IC_{30}, dakle je li pri koncentraciji koja određuje vrijednost $EC_{1,5}$ smanjenje preživljavanja stanica manje od 30 %.

▼M7

Preporučuje se da se podaci vizualno provjeravaju s pomoću grafikona. Ako se ne uočava jasna krivulja doza – odgovor ili ako dobivena krivulja doza – odgovor ima dvofazičan izgled (tj. dva puta presijeca prag od 1,5), pokus bi trebalo ponoviti kako bi se provjerilo je li taj rezultat specifičan za ispitivanu kemikaliju ili je riječ o analitičkom artefaktu. U slučaju da je dvofazični odgovor obnovljiv u neovisnom pokusu, u izvješću bi trebalo navesti nižu vrijednost $EC_{1,5}$ (koncentraciju pri kojoj krivulja prvi put presijeca prag od 1,5).

U rijetkim se slučajevima u kojima se iznad praga od 1,5 puta uočava indukcija koja nije statistički značajna, a nakon koje slijedi statistički značajna indukcija pri višoj koncentraciji, rezultati tog ponavljanja smatraju valjanima i pozitivnima jedino ako je statistički značajna indukcija iznad praga od 1,5 dobivena za koncentraciju koja nije citotoksična.

Konačno, za ispitivane kemikalije kod kojih se već i pri najnižoj ispitnoj koncentraciji od 0,98 μM javlja 1,5 puta ili veća indukcija, vrijednost $EC_{1,5} < 0,98$ utvrđuje se na temelju vizualnog pregleda krivulje doza – odgovor.

Kriteriji prihvatljivosti

Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test KeratinoSens™. Prvo, indukcija aktivnosti luciferaze dobivena s pozitivnom kontrolom, cimetnim aldehidom, trebala bi biti statistički značajna iznad praga od 1,5 (npr. na temelju T-testa) za najmanje jednu od ispitanih koncentracija (od 4 do 64 μM).

Drugo, vrijednost $EC_{1,5}$ trebala bi biti unutar dvaju standardnih odstupanja prijašnje srednje vrijednosti ispitnog laboratorija (npr. između 7 μM i 30 μM na temelju podataka upotrijebljenih za validaciju), koju bi trebalo redovito ažurirati. Osim toga, prosječna indukcija u tri ponovljena uzorka za cimetni aldehid pri 64 μM trebala bi iznositi između 2 i 8. Ako nije ispunjen potonji kriterij, odnos doza – odgovor za cimetni aldehid trebalo bi pažljivo provjeriti, a testovi mogu biti prihvaćeni jedino ako postoji jasan odnos između doze i odgovora u kojemu se indukcija aktivnosti luciferaze povećava s povećanjem koncentracija za pozitivnu kontrolu.

Konačno, prosječan koeficijent varijacije očitanih vrijednosti luminiscencije za negativnu kontrolu (s otapalom) s DMSO-om trebao bi biti ispod 20 % u svakom ponavljanju koje obuhvaća šest jažica ispitanih kao triplikat. Ako je varijabilnost veća, rezultati se odbacuju.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Predviđanje na temelju testa KeratinoSens™ smatra se pozitivnim ako su ispunjena sva četiri sljedeća uvjeta u dva od dva ponavljanja ili u ta ista dva od tri ponavljanja; u protivnom se predviđanje na temelju testa KeratinoSens™ smatra negativnim (slika 1.):

1. I_{max} veće je od (>) 1,5 puta i statistički se znatno razlikuje od vrijednosti dobivene za (negativnu) kontrolu s otapalom (kako je utvrđeno dvostranim Studentovim t-testom za neuparene podatke);

2. preživljavanje stanica veće je od (>) 70 % pri najnižoj koncentraciji za koju je povećanje indukcije luciferaze veće od 1,5 puta povećanja (tj. pri koncentraciji koja određuje $EC_{1,5}$);

3. vrijednost $EC_{1,5}$ manja je od (<) 1 000 μM (ili < 200 μg/ml za ispitivane kemikalije čija molekularna masa nije utvrđena);

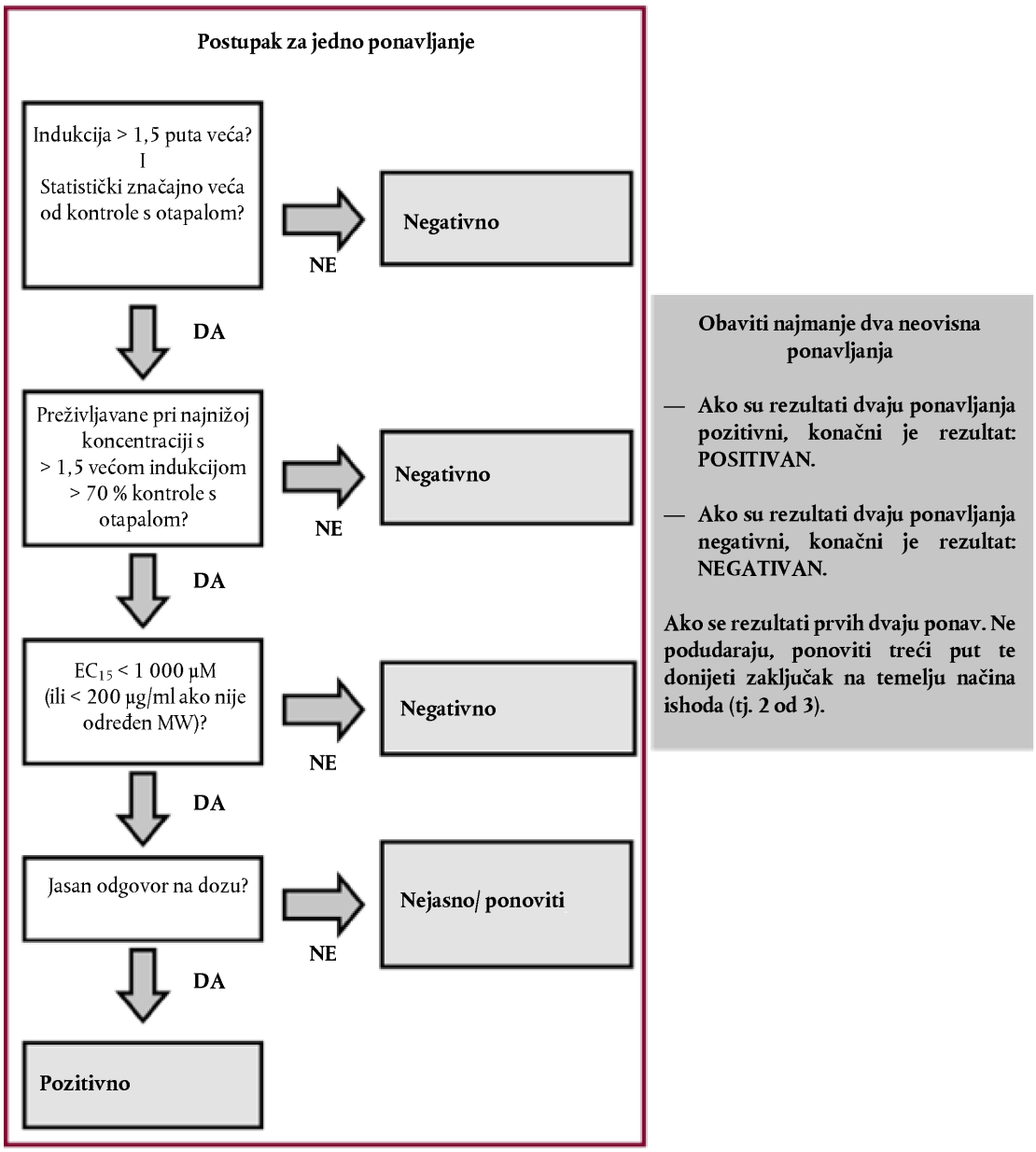
4. općenito se uočava jasan odnos između doze i odgovora za indukciju luciferaze (ili dvofazičan odgovor kako je navedeno u stavku 33.).

▼M7

Ako su u određenom ponavljanju ispunjena sva tri prva uvjeta, ali se ne može uočiti jasan odnos između doze i odgovora za indukciju luciferaze, tada bi se trebalo smatrati da je rezultat tog ponavljanja nejasan te mogu biti potrebna dodatna ispitivanja (slika 1.). Osim toga, i negativan rezultat dobiven s koncentracijama < 1 000 µM (ili < 200 µg/ml za ispitivane kemikalije čija molekularna masa nije utvrđena) isto bi tako trebalo smatrati nejasnim (vidjeti stavak 11.).

Slika 1.

Model predviđanja koji se upotrebljava u testu KeratinoSens™. Predviđanje na temelju testa KeratinoSens™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 9. i 11.



U rijetkim slučajevima, ispitivane kemikalije koje induciraju aktivnost luciferaze vrlo blizu citotoksičnih razina mogu u nekim ponavljanjima biti pozitivne pri razinama koje nisu citotoksične (tj. koncentracija koja određuje $EC_{1,5}$ niža je od (<) vrijednosti IC_{30}), a u drugim ponavljanjima samo pri razinama koje su citotoksične (tj. koncentracija koja određuje $EC_{1,5}$ veća je od (>) vrijednosti

▼M7

IC_{30}). Takve bi ispitivane kemikalije trebalo ponovno ispitati užom analizom odnosa između doze i odgovora primjenjujući niži faktor razrjeđenja (npr. 1,33 ili Ö2 (= 1,41) puta između jažica) kako bi se utvrdilo je li do indukcije došlo na citotoksičnim razinama ili nije (9.).

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

— Jednokomponentna tvar

  — kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

  — fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni;

  — čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

  — obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

  — ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

  — uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

— Višekomponentna tvar, UVCB tvar i smjesa:

  — opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

  — fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni;

  — molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje ispitivanja,

  — obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

  — ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

  — uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Kontrole

— Pozitivna kontrola

  — kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

  — fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i gdje je primjenjivo;

  — čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

  — obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

  — ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

  — uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

▼M7

— upućivanje na podatke koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju prikladnost kriterija prihvatljivosti analitičke serije, ako je primjenjivo.

— Negativna kontrola (s nosačem)

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene negativne kontrole / nosači drukčiji od onih koji su navedeni u ovoj ispitnoj metodi, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju.

Uvjeti primjene ispitne metode

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljene ispitne metode,

— upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),

— broj pasaža i stupanj konfluencije stanica upotrijebljenih za ispitivanje,

— metoda brojenja stanica koja je upotrijebljena za nasađivanje prije ispitivanja i mjere koje su poduzete kako bi se osigurao ujednačen raspored broja stanica (vidjeti stavak 20.),

— upotrijebljeni luminometar (npr. model), uključujući postavke instrumenta, upotrijebljeni supstrat luciferaze te dokaz o primjerenom mjerenju luminiscencije na temelju kontrolnog ispitivanja opisanog u Dodatku 3,

— postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tijekom vremena.

Ispitni postupak

— broj primijenjenih ponavljanja i ponovljenih uzoraka,

— koncentracije ispitivane kemikalije, postupak primjene i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,

— opis mogućih izmjena ispitne metode.

Rezultati

— tablični prikaz vrijednosti I_{max}, $EC_{1,5}$ i preživljavanja (tj. IC_{50}, IC_{30}) dobivenih za ispitivanu kemikaliju te za pozitivnu kontrolu pri svakom ponavljanju, kao i srednje vrijednosti (I_{max}: prosjek; $EC_{1,5}$ i preživljavanje: geometrijska sredina), te standardno odstupanje izračunato s pomoću podataka iz svih ponavljanja i klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,

▼M7

— koeficijent varijacije vrijednosti luminiscencije očitanih za negativnu kontrolu u svakom pokusu,

— grafički prikaz krivulja doza – odgovor za indukciju aktivnosti luciferaze i za preživljavanje,

— opis svih drugih relevantnih zapažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima

— rasprava o rezultatima dobivenima testom KeratinoSens™,

— rasprava o rezultatima ispitne metode u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključak

LITERATURA

1. United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

3. Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367–485.

4. Poglavlje B.42. ovog Priloga: Preosjetljivost kože: Analiza lokalnih limfnih čvorova.

5. Poglavlje B.6. ovog Priloga: Senzibilizacija kože.

6. Poglavlje B.50. ovog Priloga: Preosjetljivost kože: Analiza lokalnih limfnih čvorova: DA.

7. Poglavlje B.51. ovog Priloga: Preosjetljivost kože: Analiza lokalnih limfnih čvorova: BrdU-ELISA.

8. Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284–292.

9. Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281–290.

10. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779–1791.

▼M7

11. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45–49.

12. Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733–744.

13. Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337–1352.

14. EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, str. 42. Dostupno na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

15. DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, str. 17. Dostupno na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

16. Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106–121.

17. Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389–400.

18. Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze 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.

19. Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353–1364.

20. Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220–1225.

21. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683–1969.

22. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646–657.

23. OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

25. Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813–1822.

▼**M7**

26. Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301–316.

27. Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225–2232.

28. OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

29. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

30. NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. str. 186. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti”. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (29.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (2.).

ARE: element antioksidacijskog odgovora (naziva se i EpRE, element odgovora na elektrofile) je element odgovora smješten u uzvodnoj promotorskoj regiji mnogih citoprotektivnih gena i gena faze II. Ako ga aktivira Nfr2, posreduje u transkripcijskoj indukciji tih gena.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Koeficijent varijacije: mjera varijabilnosti koja se za skupinu podataka dobivenih od ponovljenih uzoraka izračunava dijeljenjem standardnog odstupanja sa srednjom vrijednošću. Može se pomnožiti sa 100 da bi se izrazila u obliku postotka.

$EC_{1,5}$: interpolirana koncentracija za indukciju luciferaze pomnoženu s 1,5.

IC_{30}: koncentracija pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 30 %.

IC_{50}: koncentracija pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50 %.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

I_{max}: maksimalni faktor indukcije luciferaze u usporedbi s (negativnom) kontrolom s otapalom izmjeren pri bilo kojoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Keap1 (***Kelch-like ECH-associated protein 1***): senzorski protein koji može regulirati aktivnost faktora Nrf2. U neinduciranim uvjetima senzorski protein Keap1 ciljano djeluje na transkripcijski faktor Nrf2 radi njegove ubikvitinacije i proteolitičke razgradnje u proteasomu. Kovalentna modifikacija reaktivnih cisteinskih ostataka proteina Keap 1 s malim molekulama može dovesti do disocijacije faktora Nrf2 od proteina Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari koje u njoj ne reagiraju (1.).

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

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

Nrf2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*): transkripcijski faktor koji je uključen u put antioksidacijskog odgovora. Kada Nrf2 nije ubikvitiniran, razvija se u citoplazmi i translocira u jezgru, gdje se veže s ARE-om u uzvodnoj promotorskoj regiji mnogih citoprotektivnih gena pokrećući njihovu transkripciju (8., 10., 11).

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

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (sukladnosti) ispitne metode (29.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (29.).

Obnovljivost: podudarnost rezultata dobivenih ispitivanjem iste kemikalije uz primjenu istog ispitnog protokola (vidjeti „pouzdanost”) (29.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (29.).

Kontrola s otapalom/nosačem: ponovljeni uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo koje se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polazne reakcije za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (29.).

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava (1.).

Ispitivana kemikalija: izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava se za označivanje onoga što se ispituje.

▼M7

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

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

Valjana ispitna metoda: ispitna metoda za koju se smatra da je dovoljno relevantna i pouzdana za određenu svrhu te koja se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitna metoda nije nikada valjana u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (29.).

▼M7

Dodatak 2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Preosjetljivost kože *in vitro:* Test luciferaze ARE-Nrf2

Prije rutinske primjene ove ispitne metode laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari koje su u tablici 1. preporučene za dokazivanje osposobljenosti dobiti očekivano predviđanje na temelju testa KeratinoSens™ te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje osposobljenosti dobiti vrijednosti $EC_{1,5}$ i IC_{50} koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Drugi kriteriji za odabir bili su komercijalna dostupnost tvari, dostupnost visokokvalitetnih referentnih podataka dobivenih *in vivo* te dostupnost visokokvalitetnih *in vitro* podataka dobivenih s pomoću testa KeratinoSens™.

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa KeratinoSens™

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Fizikalni oblik	Predviđanje *in vivo* (1)	Predviđanje (2) KeratinoSens™	Referentni raspon (3) $EC_{1,5}$ (μM)	Referentni raspon (3) IC_{50} (μM)
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 1 000	> 1 000
Salicilna kiselina	69-72-7	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 1 000	> 1 000
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 1 000	> 1 000
Cinamil alkohol	104-54-1	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	25 – 175	> 1 000
Etilen glikol dimetakrilat	97-90-5	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	5 – 125	> 500
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	25 – 250	> 500
Metildibromoglutaronitril	35691-65-7	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	< 20	20 – 100
4-metilaminofenol sulfat	55-55-0	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	< 12,5	20 – 200
2,4-dinitro-klorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	< 12,5	5 – 20

(1) Predviđanja opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelje se na podacima dobivenima s pomoću metode LLNA (13.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (24.).

(2) Predviđanje na temelju testa KeratinoSens™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 9. i 11. ove ispitne metode.

(3) Na temelju vrijednosti zapaženih u prijašnjim ispitivanjima (12.).

▼M7

Dodatak 3.

KONTROLA KVALITETE MJERENJA LUMINISCENCIJE

Osnovni pokus za osiguravanje optimalnog mjerenja luminiscencije u testu KeratinoSens™

Da bi se osiguralo dobivanje pouzdanih rezultata s pomoću luminometra, ključna su sljedeća tri parametra:

— dovoljna osjetljivost koja osigurava stabilnu pozadinu u kontrolnim jažicama,

— nepostojanje gradijenta na pločici uzrokovanog dugim vremenom očitavanja i

— u susjednim jažicama ne dolazi do kontaminacije luminiscencijom iz jažica u kojima se odvija snažna aktivnost.

Kako bi se osiguralo primjereno mjerenje luminiscencije, preporučuje se da se prije provođenja testa ispita kontrolna pločica postavljena kako je opisano u nastavku (analiza triplikata).

Raspored jažica na pločici za prvi preliminarni pokus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Prazno**

EGDMA = etilen glikol dimetakrilat (CAS br.: 97-90-5), kemikalija koja izaziva jaku indukciju

CA = cimetni aldehid, pozitivna kontrola (CAS br.: 104-55-2)

Analiza kontrole kvalitete trebala bi pokazati sljedeće:

— jasan odnos između doze i odgovora u retku D, s vrijednošću I_{max} > dvadeseterostrukog povećanja u odnosu na pozadinu (u većini se slučajeva postižu vrijednosti I_{max} između 100 i 300),

— nepostojanje odnosa između doze i odgovora u retcima C i E (vrijednosti indukcije nisu veće od 1,5 (idealno bi bilo da nisu iznad 1,3) zbog moguće kontaminacije svjetlom, posebno uz snažno aktivne jažice u retku s EGDMA-om,

— nema statistički značajne razlike između redaka A, B, C, E, F i G (tj. nema gradijenta na pločici) i

— varijabilnost u bilo kojem od redaka A, B, C, E, F i G te u jažicama s DMSO-om u retku H trebala bi biti ispod 20 % (tj. stabilna pozadina).

▼M7

B.61. METODA ISPITIVANJA PROPUŠTANJA FLUORESCEINA ZA IDENTIFIKACIJU TVARI NAGRIZAJUĆIH I JAKO NADRAŽUJUĆIH ZA OČI

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 460 (2012.). Metoda ispitivanja propuštanja fluoresceina (engl. *Fluorescein Leakage* – FL) je *in vitro* ispitna metoda koja se u određenim okolnostima i uz specifična ograničenja može upotrijebiti za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) kao tvari nagrizajućih i jako nadražujućih za oči, kako su definirane u Globalno usklađenom sustavu Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS) (kategorija 1.) i Uredbi (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u) ([1]) (kategorija 1.) te kako ih definira Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (US EPA) (kategorija I.) (1., 2.). Za potrebe ove ispitne metode tvari jako nadražujuće za oči definiraju se kao kemikalije koje nakon primjene ispitivane kemikalije uzrokuju oštećenje očnog tkiva koje nije reverzibilno unutar 21 dana ili uzrokuje teško fizičko pogoršanje vida, a tvari nagrizajuće za oči su kemikalije koje uzrokuju ireverzibilno oštećenje očnog tkiva. Te se kemikalije razvrstavaju u kategoriju 1. sustava UN GHS, kategoriju 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u ili kategoriju I. EPA-e.

Iako se ne smatra da vrijedi kao potpuna zamjena za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, metoda FL preporučuje se za primjenu kao dio strategije višerazinskog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje. Prema tome, metoda FL preporučuje se kao prvi korak u pristupu „odozgo prema dolje" u svrhu identifikacije tvari nagrizajućih / jako nadražujućih za oči, posebno za određene vrste kemikalija (tj. tvari i smjese topljive u vodi) (3., 4.).

Danas je općenito prihvaćeno da se u doglednoj budućnosti ispitivanje na očima *in vivo* (ispitna metoda B.5. (5.)) neće moći zamijeniti nekom jedinstvenom *in vitro* metodom ispitivanja nadražujućeg djelovanja na oči koja bi pokrivala čitav spektar nadražujućih učinaka različitih kategorija kemikalija. Međutim, strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja mogle bi zamijeniti *in vivo* ispitivanja na očima (4.). Pristup odozgo prema dolje (4.) namijenjen je za primjenu u slučajevima kada se na temelju postojećih informacija očekuje da kemikalija ima visok potencijal nadražujućeg djelovanja.

Prema modelu predviđanja koji je detaljnije opisan u stavku 35., ispitnom metodom FL mogu se u okviru ograničenog područja primjenjivosti identificirati kemikalije kao tvari koje su nagrizajuće / jako nadražujuće za oči (kategorija 1. sustava UN GHS; kategorija 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u; kategorija I. US EPA-e) bez dodatnih ispitivanja. Isto se pretpostavlja i za smjese, iako smjese nisu upotrijebljene u validaciji. Stoga se ispitna metoda FL može upotrijebiti za određivanje nadražujućeg/nagrizajućeg djelovanja kemikalija na oči u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja iz ispitne metode B.5. (5.). Međutim, kemikaliju za koju se na temelju ispitne metode FL ne predviđa da ima nagrizajuće ili jako nadražujuće djelovanje na oči potrebno je ispitati s pomoću još jedne ili više dodatnih metoda ispitivanja (*in vitro* i/ili *in vivo*) kojima se mogu točno identificirati i. kemikalije koje su u testu FL *in vitro* dale lažno negativne rezultate u

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

▼M7

pogledu nagrizajućeg/jako nadražujućeg djelovanja na oči (kategorija 1. sustava UN GHS; kategorija 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u; kategorija I. US EPA-e); ii. kemikalije koje nisu razvrstane s obzirom na nagrizajuće/nadražujuće djelovanje na oči (izvan kategorije prema sustavu UN GHS; izvan kategorije prema Uredbi EU-a o CLP-u; kategorija IV. US EPA-e); i/ili iii. kemikalije koje su umjereno/blago nadražujuće za oči (kategorije 2.A i 2.B sustava UN GHS; kategorija 2. prema Uredbi EU-a o CLP-u; kategorije II. i III. US EPA-e).

Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijalno nagrizajućeg ili jako nadražujućeg djelovanja ispitivane kemikalije na oči s obzirom na njezinu sposobnost da uzrokuje oštećenje nepropusnog konfluentnog epitelnog monosloja. Integritet transepitelne propusnosti glavna je funkcija epitela poput onog koji se nalazi u konjunktivi i rožnici. Transepitelnu propusnost kontroliraju razni čvrsti međustanični spojevi. Pokazalo se da je povećanje propusnosti epitela rožnice *in vivo* u korelaciji sa stupnjem upale i površinskog oštećenja opaženog pri pojavi nadražujućeg djelovanja na oko.

U ispitnoj metodi FL toksični učinci nakon kratkog izlaganja ispitivanoj kemikaliji mjere se na temelju povećanog propuštanja natrijeva fluoresceina kroz epitelni monosloj psećih bubrežnih stanica Madin Darby (MDCK) uzgojenih na propusnim umetcima. Količina propuštenog fluoresceina razmjerna je kemijski uzrokovanom oštećenju međustaničnih spojeva, dezmosoma i staničnih membrana te se na temelju nje može procijeniti potencijalna okularna toksičnost ispitivane kemikalije. U Dodatku 1. prikazan je dijagram uzgoja stanica MDCK na membrani umetka za ispitnu metodu FL.

Definicije su navedene u Dodatku 2.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ova se ispitna metoda temelji na protokolu INVITTOX br. 71 (6.) koji je ocijenjen u okviru međunarodne validacijske studije koju je proveo Europski centar za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) u suradnji s Međuagencijskim koordinacijskim odborom SAD-a za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) i Japanskim centrom za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM).

Ispitna metoda FL ne preporučuje se za identificiranje kemikalija koje bi trebalo razvrstati kao umjereno/blago nadražujuće za oči ili kemikalija koje ne bi trebalo razvrstati s obzirom na nadražujuće djelovanje na oči (tvari i smjese) (tj. kat. 2.A/2.B sustava GHS ili izvan kategorije; kat. 2. ili izvan kategorije prema Uredbi EU-a o CLP-u; kat. II./III./IV. US EPA-e), kako je pokazano validacijskom studijom (3., 7.).

Ova se ispitna metoda primjenjuje samo na kemikalije (tvari i smjese) koje su topljive u vodi. Metodom FL općenito se može točno procijeniti potencijal za jako nadražujuće djelovanje na oči kod kemikalija koje su topljive u vodi i/ili na čije toksične učinke ne utječe razrjeđenje (7.). Da bi se neka kemikalija smatrala topljivom u vodi u eksperimentalnim uvjetima, trebala bi biti topljiva u sterilnoj ujednačenoj Hanksovoj otopini soli bez fenolnog crvenila koja sadržava kalcij (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) (HBSS), pri koncentraciji ≥ 250 mg/ml (jedna doza iznad granične vrijednosti od 100 mg/ml). Međutim, ako je ispitivana kemikalija topljiva pri koncentraciji manjoj od 100 mg/ml, ali izaziva propuštanje fluoresceina (FL) od 20 % već pri toj koncentraciji (dakle ako je FL_{20} < 100 mg/ml), ipak se može razvrstati u kat. 1. sustava GHS ili kat. I. EPA-e.

S obzirom na utvrđena ograničenja ove ispitne metode iz njezinog su područja primjenjivosti isključene jake kiseline i baze, fiksativi za stanice te jako hlapljive kemikalije. Te kemikalije imaju mehanizme koji se ne mjere ispitnom metodom FL, kao što su ekstenzivna koagulacija, saponifikacija ili specifične kemijske

▼M7

reakcije. Ostala utvrđena ograničenja ove ispitne metode temelje se na rezultatima u pogledu prediktivnosti za obojene i viskozne ispitivane kemikalije (7.). S obzirom na to da je obje vrste kemikalija teško ukloniti iz monosloja nakon kratkog razdoblja izlaganja, sugerira se da bi se prediktivnost ispitne metode mogla poboljšati kad bi se primijenio veći broj faza ispiranja. Krute kemikalije suspendirane u tekućini sklone su taloženju te može biti teško odrediti konačnu koncentraciju kojoj su izložene stanice. Ako se kemikalije koje spadaju u navedene kemijske i fizikalne kategorije isključe iz baze podataka, točnost metode FL u sustavima za razvrstavanje EU-a, EPA-e i GHS bitno se poboljšava (7.).

Imajući u vidu svrhu ove ispitne metode (a to je identifikacija samo onih tvari koje su nagrizajuće / jako nadražujuće za oči), stopa lažno negativnih rezultata (vidjeti stavak 13.) nije od presudne važnosti jer će se takve kemikalije naknadno ispitati drugim odgovarajućim validiranim *in vitro* testovima ili na kunićima, ovisno o regulatornim zahtjevima, primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja koja se temelji na ocjenjivanju snage dokaza (5.) (vidjeti i stavke 3. i 4.).

Ostala utvrđena ograničenja ispitne metode FL temelje se na stopama lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata. Kada se ispitna metoda FL primjenjuje kao početni korak u pristupu odozgo prema dolje radi identifikacije tvari i smjesa topljivih u vodi koje nagrizaju / jako nadražuju oči (kategorija 1. sustava UN GHS; kategorija 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u; kategorija I. US EPA-e), stopa lažno pozitivnih rezultata kreće se u rasponu od 7 % (7/103; UN GHS i Uredba EU-a o CLP-u) do 9 % (9/99; US EPA), a stopa lažno negativnih rezultata kreće se u rasponu od 54 % (15/28; US EPA) do 56 % (27/48; UN GHS i Uredba EU-a o CLP-u) u usporedbi s rezultatima *in vivo*. Ovdje se ne definiraju kemijske skupine koje pokazuju lažno pozitivne i/ili lažno negativne rezultate u ispitnoj metodi FL.

Određena tehnička ograničenja specifična su za staničnu kulturu MDCK. Što je veći broj pasaža stanica, to je slabija kvaliteta čvrstih međustaničnih spojeva koji blokiraju prolaz boje natrijevog fluoresceina kroz monosloj. Nepotpuno formiranje čvrstih međustaničnih spojeva dovodi do povećanog propuštanja fluoresceina u netretiranoj kontroli. Stoga je važno utvrditi najveći dopušteni stupanj propuštanja u netretiranim kontrolama (vidjeti stavak 38.: propuštanje od 0 %). Kao i kod svih pokusa *in vitro,* postoji mogućnost da tijekom vremena dođe do transformacije stanica, pa je stoga od ključne važnosti odrediti raspon broja pasaža u pokusima.

Trenutačno područje primjene u nekim bi se slučajevima moglo proširiti, ali tek nakon što se analizira prošireni skup podataka o istraživanim kemikalijama, koji je po mogućnosti dobiven ispitivanjima (3.). Ova će se ispitna metoda ažurirati na odgovarajući način nakon što se razmotre nove informacije i podaci.

Svaki laboratorij koji prvi put počinje primjenjivati ovaj test trebao bi upotrijebiti kemikalije iz Dodatka 3. koje služe za dokazivanje tehničke osposobljenosti. Laboratoriji mogu upotrijebiti te kemikalije kako bi dokazali svoju tehničku osposobljenost za provođenje ispitne metode FL prije nego što podatke iz testa FL dostave za razvrstavanje prema stupnju opasnosti u regulatorne svrhe.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitna metoda FL je *in vitro* test koji se temelji na parametrima citotoksičnosti i staničnih funkcija te se provodi na konfluentnom monosloju tubularnih epitelnih stanica MDCK CB997 koje su uzgojene na nepropusnim umetcima i model su neproliferirajućeg stanja epitela rožnice *in vivo*. Stanična linija MDCK dobro je poznata i stvara čvrste međustanične spojeve i dezmosome slične onima koji se nalaze na apikalnoj strani epitela konjunktive i rožnice. Čvrsti međustanični spojevi i dezmosomi *in vivo* sprečavaju da otopljene i strane tvari prodru kroz epitel rožnice. Gubitak transepitelne nepropusnosti zbog oštećenja čvrstih međustaničnih spojeva i dezmosoma jedan je od prvih događaja koji se javlja kod kemijski izazvanog nadraživanja oka.

▼M7

Ispitivana se kemikalija nanosi na konfluentni sloj stanica uzgajanih na apikalnoj strani umetka. U pravilu se primjenjuje kratko jednominutno vrijeme izlaganja kako bi se odrazio uobičajeni *klirens* kod izloženosti ljudi. Prednost kratkog vremena izlaganja u tome je da se tvari i smjese na osnovi vode mogu ispitati čiste ako se mogu lako ukloniti po isteku razdoblja izlaganja. To omogućuje izravnije usporedbe rezultata s kemijskim učincima kod ljudi. Ispitivana se kemikalija potom uklanja te se na apikalnu stranu monosloja 30 minuta dodaje netoksična, visoko fluorescentna boja natrijevog fluoresceina. Oštećenje koje je ispitivana kemikalija uzrokovala na čvrstim međustaničnim spojevima određuje se količinom fluoresceina koja u određenom razdoblju prođe kroz sloj stanica.

Količina boje natrijevog fluoresceina koja prođe kroz monosloj i membranu umetka u određeni volumen otopine u jažici (u koju curi boja natrijevog fluoresceina) određuje se spektrofluorometrijskim mjerenjem koncentracije fluoresceina u jažici. Količina propuštanja fluoresceina (FL) izračunava se u odnosu na intenzitet fluorescencije (FI) izmjeren u dvjema kontrolama: slijepoj probi i kontroli s maksimalnim propuštanjem. Postotak propuštanja, a time i stupanj oštećenja čvrstih međustaničnih spojeva, izražava se, u odnosu na te kontrole, za svaku od zadanih koncentracija ispitivane kemikalije. Potom se izračunava FL_{20} (tj. koncentracija koja uzrokuje propuštanje fluoresceina u vrijednosti od 20 % u odnosu na vrijednost zabilježenu za netretirani konfluentni monosloj i umetke bez stanica). Vrijednost FL_{20} (mg/ml) upotrebljava se u modelu predviđanja za identifikaciju tvari koje nagrizaju i jako nadražuju oči (vidjeti stavak 35.).

Iskorištenje je važan dio profila toksičnosti ispitivane kemikalije te se isto tako ispituje *in vivo* ispitivanjem nadraživanja oka. Preliminarne su analize pokazale da bi podaci o iskorištenju (do 72 sata nakon izlaganja kemikaliji) mogli povećati prediktivnu sposobnost protokola INVITTOX 71, ali potrebna su dodatna ocjenjivanja za koja bi bilo korisno imati dodatne podatke koji su po mogućnosti dobiveni dodatnim ispitivanjima (6.). Ova će se ispitna metoda ažurirati na odgovarajući način nakon što se razmotre nove informacije i podaci.

POSTUPAK

Priprema staničnog monosloja

Monosloj stanica MDCK CB997 priprema se upotrebom subkonfluentnih stanica uzgajanih u bocama za uzgoj staničnih kultura u Dulbeccovom modificiranom Eagleovu mediju (DMEM) i hranjivoj mješavini F12 (1x koncentrat s L-glutaminom, 15 mM HEPES-a, kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) i 10 % fetalnog telećeg/goveđeg seruma (FCS/FBS) inaktiviranog toplinom). Važno je da svi mediji/otopine upotrijebljeni tijekom testa FL sadržavaju kalcij u koncentraciji između 1,0 mM (111 mg/l) i 1,8 mM (200 mg/l) kako bi se osiguralo stvaranje i integritet čvrstih međustaničnih spojeva. Trebalo bi kontrolirati raspon broja pasaža stanica kako bi se osiguralo ujednačeno i obnovljivo stvaranje čvrstih međustaničnih spojeva. Broj pasaža stanica trebao bi se po mogućnosti kretati u rasponu od tri do 30 nakon odmrzavanja jer stanice u tom rasponu imaju sličnu funkcionalnost, što pridonosi obnovljivosti rezultata testa.

Prije provođenja ispitne metode FL stanice se odvajaju od bočice tripsinizacijom te se centrifugiraju i odgovarajuća se količina stanica nasađuje na umetke postavljene na pločice s 24 jažice (vidjeti Dodatak 1.). Za nasađivanje stanica trebalo bi upotrijebiti umetke promjera dvanaest milimetara s membranom od mješovitih celuloznih estera, debljine od 80 do 150 μm i s porama veličine 0,45 μm. U validacijskoj su studiji upotrijebljeni umetci Millicell-HA 12 mm. Značajke umetka i vrsta membrane važni su jer mogu utjecati na rast stanica i stvaranje kemijskih veza. Neke se vrste kemikalija mogu vezati na membranu umetka Millicell-HA, što bi moglo utjecati na tumačenje rezultata. Ako se upotrebljavaju druge membrane, njihovu bi jednakovrijednost trebalo dokazati s pomoću kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti (vidjeti Dodatak 3.).

▼M7

Stvaranje kemijske veze s membranom umetka češće se javlja kod kationskih kemikalija kao što je benzalkonijev klorid, koje privlači nabijena membrana (7.). Stvaranje kemijske veze s membranom umetka može dovesti do produljenja razdoblja izlaganja, a time i do precjenjivanja toksičkog potencijala kemikalije, ali isto tako može dovesti i do fizičkog smanjenja propuštanja fluoresceina kroz umetak zbog vezanja boje na kationsku kemikaliju koja je vezana na membranu umetka, a time i do podcjenjivanja toksičkog potencijala kemikalije. Navedena se pojava može izravno ocijeniti izlaganjem same membrane najvišoj koncentraciji ispitane kemikalije te potom dodavanjem boje natrijevog fluoresceina u uobičajenoj koncentraciji tijekom standardnog vremena izlaganja (bez kontrole sa stanicama). Ako dođe do vezanja boje natrijevog fluoresceina, membrana umetka požutjet će nakon ispiranja ispitnog materijala. Stoga je ključno poznavati vezivna svojstva ispitivane kemikalije da bi se mogao protumačiti njezin učinak na stanice.

Nasađivanjem stanica na umetke trebao bi se dobiti konfluentan monosloj u trenutku izlaganja kemikaliji. Trebalo bi dodati $1,6 \times 10^5$ stanica po umetku (400 µl suspenzije stanica gustoće 4×10^5 stanica / ml). U tim se uvjetima konfluentan monosloj obično dobije nakon 96 sati uzgoja. Umetke bi trebalo vizualno pregledati prije nasađivanja kako bi se osiguralo da sva eventualna oštećenja zabilježena vizualnim pregledom opisanim u stavku 30. proizlaze iz rukovanja.

Stanične kulture MDCK trebalo bi držati u inkubatorima u vlažnoj atmosferi pri 5 % ± 1 % CO_2 i 37 ± 1 °C. Stanice ne smiju biti kontaminirane bakterijama, virusima, mikoplazmom i gljivicama.

Primjena ispitivanih i kontrolnih kemikalija

Za svaki analitički ciklus potrebno je pripremiti svježu radnu otopinu te je upotrijebiti u roku od 30 minuta od pripreme. Ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u HBSS-u s kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) bez fenolnog crvenila kako bi se spriječilo vezanje s proteinima seruma. Prije ispitivanja trebalo bi procijeniti topljivost kemikalije pri koncentraciji od 250 mg/ml u HBSS-u. Ako pri toj koncentraciji kemikalija stvori stabilnu suspenziju ili emulziju (tj. ostane ujednačena i ne nataloži se niti razdvoji na više faza) tijekom 30 minuta, HBSS se može upotrijebiti kao otapalo. Međutim, ako se pokaže da je pri toj koncentraciji kemikalija netopljiva u HBSS-u, trebalo bi razmisliti o primjeni drugih ispitnih metoda umjesto metode FL. Upotrebu mineralnog ulja niske viskoznosti kao otapala u slučajevima kada se pokaže da kemikalija nije topljiva u HBSS-u trebalo bi uzeti u obzir s oprezom jer dostupni podaci nisu dostatni za donošenje zaključka o uspješnosti testa FL u tim uvjetima.

Sve kemikalije koje treba ispitati pripremaju se iz radne otopine, u sterilnom HBSS-u s kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) bez fenolnog crvenila, u pet razrjeđenja s fiksnim masenim koncentracijama: 1, 25, 100, 250 mg/ml te jedna čista ili zasićena otopina. Kada se ispituje kruta kemikalija, trebalo bi uključiti vrlo visoku koncentraciju od 750 mg/ml. Tu bi koncentraciju kemikalije trebalo nanijeti na stanice s pomoću pipete koja radi na načelu pozitivnog istisnog volumena. Ako se pokaže da se toksični učinci javljaju između 25 i 100 mg/ml, trebalo bi dva puta ispitati sljedeće dodate koncentracije: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Iz tih se koncentracija izvodi vrijednost FL_{20} pod uvjetom da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti.

Ispitivane se kemikalije nanose na konfluentne monoslojeve stanica nakon što se hranjiva podloga za uzgoj stanica ukloni te monoslojevi isperu dva puta sterilnim, toplim (37 °C) HBSS-om s kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) bez fenolnog crvenila. Filteri su prije toga bili vizualno pregledani kako bi se provjerilo postoje li otprije prisutna oštećenja koja bi se mogla pogrešno pripisati

▼M7

potencijalnoj inkompatibilnosti s ispitivanim kemikalijama. Za svaku koncentraciju ispitivane kemikalije te za kontrole trebalo bi upotrijebiti najmanje tri ponovljena uzorka u svakom analitičkom ciklusu. Nakon jedne minute izlaganja na sobnoj temperaturi ispitivanu kemikaliju trebalo bi pažljivo ukloniti aspiracijom, monosloj bi trebalo dva puta isprati sterilnim, toplim (37 °C) HBSS-om s kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) bez fenolnog crvenila te bi trebalo odmah izmjeriti propuštanje fluoresceina.

U svakom bi analitičkom ciklusu trebalo upotrijebiti istodobne negativne (NK) i pozitivne kontrole (PK) kako bi se dokazalo da su integritet monosloja (NK) i osjetljivost stanica (PK) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Za PK se preporučuje upotrijebiti kemikaliju brij 35 (CAS br. 9002-92-0) u koncentraciji od 100 mg/ml. Pri toj bi koncentraciji propuštanje fluoresceina trebalo iznositi oko 30 % (prihvatljivi raspon propuštanja fluoresceina tj. oštećenja sloja stanica: od 20 do 40 %). Za NK se preporučuje upotrijebiti HBSS s kalcijem (u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM) bez fenolnog crvenila (netretirana slijepa proba). U svaki bi ciklus trebalo uključiti i kontrolu s maksimalnim propuštanjem kako bi se mogle izračunati vrijednosti FL_{20}. Maksimalno se propuštanje određuje s pomoću kontrolnog umetka bez stanica.

Određivanje propuštanja fluoresceina

Odmah nakon uklanjanja ispitivanih i kontrolnih kemikalija dodaje se u umetke (npr. Millicell-HA) 400 µl otopine natrijevog fluoresceina u koncentraciji od 0,1 mg/ml (0,01 % (w/v) u HBSS-u s kalcijem [u koncentraciji od 1,0 do 1,8 mM] bez fenolnog crvenila. Kulture se drže 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju inkubacije s fluoresceinom umetci se pažljivo vade iz jažica. Svaki se filter vizualno pregledava te se bilježi svako eventualno oštećenje nastalo tijekom rukovanja.

Količina fluoresceina propuštenog kroz monosloj i umetak mjeri se u otopini koja preostane u jažicama nakon uklanjanja umetaka. Mjerenja se provode spektrofluorimetrom na valnim duljinama ekscitacije i emisije od 485 nm odnosno 530 nm. Osjetljivost spektrofluorimetra trebalo bi podesiti tako da se dobije najveća numerička razlika između maksimalnog propuštanja fluoresceina (umetak bez stanica) i minimalnog propuštanja fluoresceina (umetak s konfluentnim monoslojem tretiranim NK-om). Zbog razlika u upotrebljavanim spektrofluorimetrima predlaže se da osjetljivost bude takva da se u kontroli s maksimalnim propuštanjem fluoresceina dobije intenzitet fluorescencije > 4 000. Vrijednost maksimalnog propuštanja fluoresceina ne bi smjela biti veća od 9 999. Intenzitet fluorescencije koji odgovara maksimalnom propuštanju fluoresceina trebao bi biti unutar linearnog mjernog područja upotrijebljenog spektrofluorimetra.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Količina propuštenog fluoresceina razmjerna je kemijski uzrokovanom oštećenju čvrstih međustaničnih spojeva. Postotak propuštanja fluoresceina za svaku ispitanu koncentraciju kemikalije izračunava se iz vrijednosti propuštanja fluoresceina dobivenih za ispitivanu kemikaliju u odnosu na vrijednosti propuštanja fluoresceina u NK-u (očitani rezultat za konfluentni monosloj stanica tretiran NK-om) i kontrolu s maksimalnim propuštanjem fluoresceina (očitana količina fluoresceina propuštenog kroz umetak bez stanica).

Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije pri maksimalnom propuštanju = x

Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije pri propuštanju od 0 % (NK) = y

Srednja vrijednost propuštanja od 100 % dobije se tako da se od srednje vrijednosti pri maksimalnom propuštanju oduzme srednja vrijednost pri propuštanju od 0 %,

tj. $x - y = z$

Za svaku fiksnu dozu postotak propuštanja izračunava se tako da se propuštanje od 0 % oduzme od srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije očitanih za tri ponovljena uzorka (m) te tako dobivena vrijednost podijeli s vrijednošću propuštanja od 100 %, tj. % $FL = [(m-y) / z] \times 100$ %, pri čemu je:

▼M7

m = srednja vrijednost intenziteta fluorescencije za tri ponovljena uzorka predmetne koncentracije

% FL = postotak fluoresceina propuštenog kroz sloj stanica

Trebalo bi primijeniti sljedeću jednadžbu za izračun kemijske koncentracije koja uzrokuje propuštanje fluoresceina od 20 %:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

pri čemu je:

D = % inhibicije

A = % oštećenja (propuštanje fluoresceina od 20 %)

B = % propuštanja fluoresceina < A

C = % propuštanja fluoresceina > A

M_C = koncentracija (mg/ml) C

M_B = koncentracija (mg/ml) B

U nastavku je navedena granična vrijednost za FL_{20} na temelju koje se predviđa da su kemikalije nagrizajuće / jako nadražujuće za oči:

FL_{20} (mg/ml)	R i O prema sustavu UN GHS	R i O prema Uredbi EU-a o CLP-u	R i O prema US EPA-i
≤ 100	kategorija 1.	kategorija 1.	kategorija I.

R i O: razvrstavanje i označivanje

Ispitna metoda FL preporučuje se jedino za identifikaciju tvari nagrizajućih i jako nadražujućih za oči koje su topljive u vodi (kategorija 1. sustava UN GHS, kategorija 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u, kategorija I. US EPA-e) (vidjeti stavke 1. i 10.).

Da bi se kemikalija koja je topljiva u vodi (tvar ili smjesa) (3., 6., 7.) mogla identificirati kao tvar koja „izaziva tešku ozljedu oka” (kategorija 1. sustava UN GHS / prema Uredbi EU-a o CLP-u) ili kao tvar koja „nadražuje ili jako nagriza oči” (kategorija I. US EPA-e), ispitivana kemikalija trebala bi dovesti do vrijednosti $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

Prihvaćanje rezultata

Srednja vrijednost maksimalnog propuštanja fluoresceina (x) trebala bi biti veća od 4 000 (vidjeti stavak 31.), srednja vrijednost propuštanja od 0 % (y) trebala bi iznositi 300 ili manje, a srednja vrijednost propuštanja od 100 % (z) trebala bi biti između 3 700 i 6 000.

Ispitivanje se smatra prihvatljivim ako je pozitivna kontrola izazvala oštećenje 20 % do 40 % sloja stanica (određeno kao postotak propuštanja fluoresceina).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

Za svaki analitički ciklus, podatke o jažicama koje odgovaraju pojedinačnim ponovljenim uzorcima (npr. vrijednosti intenziteta fluorescencije te podaci o izračunatom postotku propuštanja fluoresceina za svaku ispitivanu kemikaliju, uključujući njezino razvrstavanje) trebalo bi predstaviti u obliku tablice. Osim toga, trebalo bi prijaviti i srednje vrijednosti ± standardno odstupanje za mjerenja koja odgovaraju pojedinačnim ponovljenim uzorcima u svakom ciklusu.

▼M7

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane i kontrolne kemikalije

— kemijski naziv(i) kao što je strukturni naziv iz popisa CAS-a (*Chemical Abstract Service*) i ostali nazivi ako su poznati,

— CAS broj kemikalije, ako je poznat,

— čistoća i sastav tvari ili smjese (u postotku/postotcima masenog udjela), u mjeri u kojoj su ti podaci dostupni,

— fizikalno-kemijska svojstva bitna za provedbu istraživanja (npr. fizikalno stanje, hlapljivost, pH, stabilnost, topljivost u vodi, kemijski razred),

— obrada ispitivane/kontrolne kemikalije prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uvjeti skladištenja;

Obrazloženje upotrijebljene ispitne metode i protokola

— trebalo bi uključivati razmatranja o području primjenjivosti i ograničenjima ispitne metode;

Uvjeti ispitivanja

— opis upotrijebljenog staničnog sustava, uključujući potvrdu o autentičnosti i mikoplazmatski status stanične linije,

— pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku,

— upotrijebljena koncentracija (koncentracije) ispitivane kemikalije,

— trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji,

— trajanje inkubacije s fluoresceinom,

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja,

— upućivanje na prijašnje podatke modela (npr. negativne i pozitivne kontrole, referentne kemikalije, ako je primjenjivo),

— informacije o tehničkoj osposobljenosti koju je laboratorij dokazao;

Rezultati

— tablični prikaz podataka dobivenih za pojedinačne ispitivane kemikalije za svaki analitički ciklus i svaki ponovljeni uzorak (uključujući pojedinačne rezultate, srednje vrijednosti i standardna odstupanja),

— utvrđeno razvrstavanje (razvrstavanja), s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja i/ili kriterije odlučivanja,

— opis drugih zapaženih učinaka;

▼**M7**

Rasprava o rezultatima

— trebala bi uključivati razmatranja o nejasnim rezultatima (stavak 35.: FL_{20} > 100 mg/ml) i daljnjim ispitivanjima;

Zaključci

LITERATURA

1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

2. U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

3. EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

4. 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

5. Poglavlje B.5. ovog Priloga, *Akutno nadraživanje/nagrizanje očiju*

6. EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Dostupno na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu]

7. EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

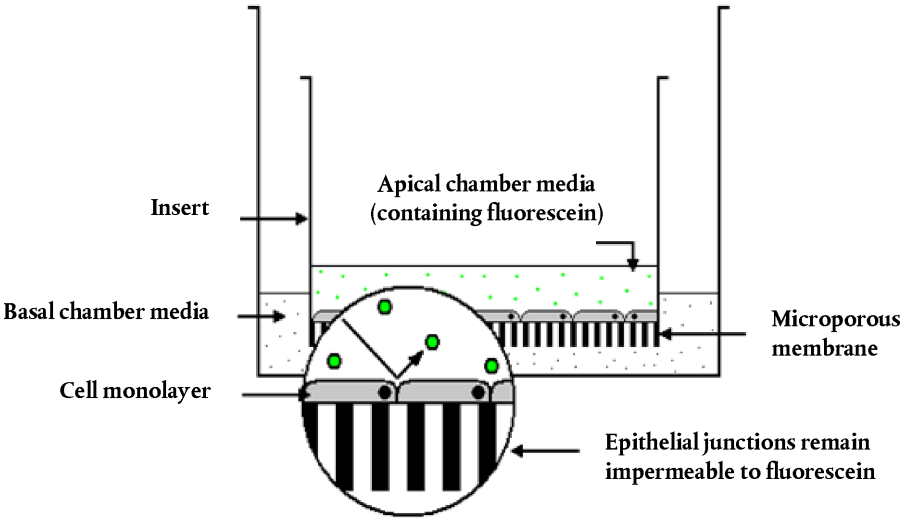
8. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Dodatak 1.

PRIKAZ UZGOJA STANICA MDCK NA MEMBRANI UMETKA ZA ISPITNU METODU FL

Konfluentni sloj stanica MDCK uzgaja se na polupropusnoj membrani umetka. Umetci se postavljaju u jažice na pločicama s 24 jažice.



Slika je uzeta iz: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Dodatak 2.

DEFINICIJE

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Kategorija I. EPA-e: kemikalije koje izazivaju nagrizanje (ireverzibilna oštećenja očnog tkiva) ili komplikacije rožnice ili nadraženost koji traju dulje od 21 dana (2.).

Uredba EU-a o CLP-u (Uredba (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa): njome se u Europskoj uniji (EU) provodi sustav UN GHS za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa).

Stopa lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

FL_{20}: može se procijeniti određivanjem koncentracije pri kojoj ispitana kemikalija uzrokuje da se 20 % fluoresceina propusti kroz sloj stanica.

Propuštanje fluoresceina: količina fluoresceina koja prođe kroz sloj stanica, izmjerena spektrofluorometrijski.

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

Kategorija 1. sustava GHS: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

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

Negativna kontrola: netretiran ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

▼M7

Nerazvrstana: kemikalija koja nije razvrstana kao tvar nagrizajuća za oči u kategoriju 1., 2.A ili 2.B sustava UN GHS, kategoriju 1. ili 2. prema Uredbi EU-a o CLP-u ili kategoriju I., II. ili III. US EPA-e.

Tvar nagrizajuća za oči: (a) kemikalija koja uzrokuje ireverzibilno oštećenje očnog tkiva; (b) kemikalija koja je razvrstana kao tvar nadražujuća za oči u kategoriju 1. sustava UN GHS, kategoriju 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u ili kategoriju I. US EPA-e.

Tvar nadražujuća za oči: (a) kemikalija koja nakon primjene na prednjoj površini oka dovodi do reverzibilne promjene u oku; (b) kemikalija koja je razvrstana kao tvar nadražujuća za oči u kategoriju 2.A ili 2.B sustava UN GHS, kategoriju 2. prema Uredbi EU-a o CLP-u ili kategoriju II. ili III. US EPA-e.

Tvar jako nadražujuća za oči: (a) kemikalija koja nakon primjene na prednjoj površini oka uzrokuje oštećenje očnog tkiva koje nije reverzibilno unutar 21 dana od primjene ili uzrokuje ozbiljno fizičko pogoršanje vida; (b) kemikalija koja je razvrstana kao tvar nadražujuća za oči u kategoriju 1. sustava UN GHS, kategoriju 1. prema Uredbi EU-a o CLP-u ili kategoriju I. US EPA-e.

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

Kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti: skupina kemikalija koje se nalaze na popisu referentnih kemikalija i koje laboratorij koji još nikada nije primijenio validiranu referentnu metodu može upotrijebiti kako bi dokazao tehničku osposobljenost za provođenje te metode.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (sukladnosti) ispitne metode (8.).

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

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

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (8.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila polazna reakcija za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom

▼M7

otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom negativnom kontrolom, taj uzorak isto tako pokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

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

Tvar: u kontekstu sustava UN GHS znači kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ne može odrediti potencijal ispitivane kemikalije za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevitog sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (8.).

Ocjenjivanje snage dokaza: proces razmatranja prednosti i nedostataka različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti kemikalije.

▼M7

Dodatak 3.

KEMIKALIJE ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI ZA ISPITNU METODU FL

Prije rutinske primjene ove ispitne metode laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako da za osam kemikalija preporučenih u tablici 1. točno identificiraju kategoriju nagrizajućeg djelovanja na oči. Te su kemikalije izabrane tako da predstavljaju niz reakcija na lokalno nadraživanje/nagrizanje očiju koje se temelje na rezultatima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (TG 405, ispitna metoda B.5. (5.)) (tj. kategorije 1., 2.A, 2.B ili nisu razvrstane prema sustavu UN GHS). Međutim, uzimajući u obzir validiranu korisnost testa FL (samo za identifikaciju tvari s nagrizajućim / jako nadražujućim djelovanjem na oči), samo dva rezultata testa dobivena u svrhu razvrstavanja tvari (nagrizajuća / jako nadražujuća ili nije nagrizajuća / nije jako nadražujuća) omogućuju dokazivanje tehničke osposobljenosti. Drugi kriteriji za odabir bili su da kemikalije budu komercijalno dostupne, da su dostupni visokokvalitetni referentni podaci dobiveni *in vivo* te da postoje visokokvalitetni podaci dobiveni s pomoću ispitne metode FL. Zbog toga su kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane s popisa navedenog u dokumentu „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing” (8.), koji je upotrijebljen za retrospektivnu validaciju ispitne metode FL.

Tablica 1.

Preporučene kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa FL

Kemikalija	CAS br.	Kemijski razred (1)	Fizikalni oblik	Razvrstavanje *in vivo* (2)	Razvrstavanje *in vitro* (3)
Benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/jako nadražujuća tvar
Prometazin hidroklorid	58-33-3	Amin/amidin, heterociklični, organosumporni spoj	Kruta tvar	Kategorija 1.	Nagrizajuća/jako nadražujuća tvar
Natrijev hidroksid (10 %)	1310-73-2	Lužina	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/jako nadražujuća tvar
Natrijev lauril sulfat (15 %)	151-21-3	Karboksilna kiselina (sol)	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/jako nadražujuća tvar
4-karboksi-benzaldehid	619-66-9	Karboksilna kiselina, aldehid	Kruta tvar	Kategorija 2(A)	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća tvar
Amonijev nitrat	6484-52-2	Anorganska sol	Kruta tvar	Kategorija 2(A)	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća tvar
Etil-2-metilaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Tekućina	Kategorija 2(B)	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća tvar
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Tekućina	Izvan kategorije	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća tvar

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

(1) Za svaku ispitivanu kemikaliju određeni su kemijski razredi uz primjenu standardne sheme razvrstavanja na temelju sustava razvrstavanja Nacionalne knjižnice oznaka medicinskog nazivlja (MeSH) (dostupno na adresi http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (smjernica OECD-a za ispitivanje (TG) 405, ispitna metoda B.5.) i primjenom sustava UN GHS i Uredbe EU-a o CLP-u.

(3) Na temelju rezultata dobivenih s pomoću testa FL (protokol INVITTOX br. 71 (6)).

▼M7

B.62. *IN VIVO* ALKALNI KOMET-TEST NA STANICAMA SISAVACA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 489 (2016.). Alkalni komet-test *in vivo* (*single cell gel electrophoresis* – elektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu; dalje u tekstu: komet-test) upotrebljava se za otkrivanje lomova lanaca DNK u stanicama ili jezgrama izoliranima iz različitih tkiva životinja, obično glodavaca, koji su bili izloženi potencijalno genotoksičnom materijalu (materijalima). Različite stručne skupine pregledale su komet-test te objavile svoje preporuke (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10.). Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. Sastavljen je dokument OECD-a u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena tih smjernica za ispitivanje (1).

Namjena je komet-testa identificiranje kemikalija koje uzrokuju oštećenje DNK. U alkalnim uvjetima (pH > 13) komet-testom mogu se otkriti jednolančani i dvolančani lomovi nastali, primjerice, zbog izravnih interakcija s DNK, zbog alkalno labilnih mjesta ili prolaznih lomova lanaca DNK nastalih tijekom ekscizijskog popravka. Ti se lomovi lanca mogu popraviti tako da nemaju trajnog učinka, mogu biti smrtonosni za stanicu ili se mogu fiksirati u mutaciju dovodeći do trajne održive promjene. Mogu isto tako dovesti i do kromosomskih oštećenja koja su također povezana s mnogim bolestima u ljudi, uključujući rakom.

Formalno validacijsko ispitivanje komet-testa *in vivo* na glodavcima provedeno je u razdoblju od 2006. do 2012. i njime je koordinirao Japanski centar za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM) u suradnji s Europskim centrom za validaciju alternativnih metoda (ECVAM), Međuagencijskim koordinacijskim odborom za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) te NTP-ovim Međuagencijskim centrom za evaluaciju alternativnih toksikoloških metoda (NICEATM) (12.). Ovom su ispitnom metodom obuhvaćeni preporučena primjena i ograničenja komet-testa i ona se temelji na konačnom protokolu (12.) upotrijebljenom u validacijskom ispitivanju te na dodatnim relevantnim objavljenim i neobjavljenim podacima (vlasnički podaci laboratorija).

Definicije ključnih pojmova nalaze se u Dodatku 1. Napominje se da se za ovaj test može upotrijebiti niz različitih platformi (mikroskopska predmetna stakalca, stakalca za gel, pločice s 96 jažica itd.). Zbog praktičnih razloga u nastavku ovog dokumenta upotrebljava se izraz „predmetno stakalce”, ali on obuhvaća i sve ostale platforme.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Komet-test je metoda mjerenja lomova lanaca DNK u eukariotskim stanicama. Pojedinačne stanice/jezgre uklopljene u agarozu na predmetnom stakalcu liziraju se s pomoću deterdženta i visoke koncentracije soli. Liziranje dovodi do pucanja stanične i jezgrine membrane te omogućuje otpuštanje petlji zavijene DNK koje se obično nazivaju nukleoidi i fragmenti DNK. Elektroforeza pri visokoj pH-vrijednosti dovodi do nastanka struktura sličnih kometima, koje se nakon bojenja odgovarajućim fluorescentnim bojama mogu promatrati s pomoću fluorescentnog mikroskopa; fragmeni DNK migriraju iz „glave” kometa u njegov „rep”, ovisno o njihovoj veličini, a intenzitet repa kometa u odnosu na ukupni intenzitet (glava plus rep) odražava količinu lomova DNK (13., 14., 15.).

Alkalni komet-test *in vivo* posebno je prikladan za ocjenjivanje genotoksične opasnosti jer reakcije u testu ovise o svojstvima ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje) *in vivo* kao i o procesima popravka DNK. Ona se mogu razlikovati među vrstama, tkivima i vrstama oštećenja DNK.

▼M7

Kako bi se ispunili zahtjevi u pogledu dobrobiti životinja, posebno oni koji se odnose na smanjenje upotrebe životinja (načelo 3R – *replacement, reduction, refinement* – to jest zamjena, smanjenje broja, poboljšanje pokusa), ovaj se test može uklopiti i u druga toksikološka istraživanja, npr. istraživanja toksičnosti uz primjenu ponovljenih doza (10., 16., 17.), ili se krajnje točke mogu kombinirati s drugim krajnjim točkama genotoksičnosti, kao što je *in vivo* mikronukleus-test na eritrocitima sisavaca (18., 19., 20.). Komet-test najčešće se provodi na glodavcima, iako je bio primijenjen i na drugim sisavcima i vrstama koje nisu sisavci. Upotrebu vrsta koje nisu glodavci trebalo bi znanstveno i etički opravdati u svakom pojedinačnom slučaju te se snažno preporučuje da se komet-test na vrstama koje nisu glodavci provodi samo u okviru nekog drugog istraživanja toksičnosti, a ne kao samostalan test.

Način izlaganja i tkivo (tkiva) koji će se ispitivati trebalo bi izabrati na temelju svih dostupnih/postojećih spoznaja o ispitivanim kemikalijama, npr. planiranog/očekivanog načina izlaganja ljudi, metabolizma i distribucije, potencijalnih učinaka na mjestu kontakta, rizičnih strukturnih elemenata i drugih podataka o genotoksičnosti ili toksičnosti, te na temelju svrhe ispitivanja. Tako se, prema potrebi, genotoksični potencijal ispitivanih kemikalija može istražiti u ciljnom tkivu (tkivima) za karcinogene i/ili druge toksične učinke. Smatra se da je ovaj test koristan i za daljnja istraživanja genotoksičnosti otkrivene s pomoću sustava *in vitro*. Primjereno je provesti komet-test *in vivo* na određenom tkivu ako se može opravdano očekivati da će to tkivo biti izloženo na odgovarajući način.

Test je najopsežnije validiran na somatskim tkivima mužjaka štakora u okviru međulaboratorijskih ispitivanja poput onog koji je proveo JaCVAM (12.) i u Rothfuss *et al*., 2010. (10.). U međunarodnom validacijskom ispitivanju koje je proveo JaCVAM upotrijebljeni su jetra i želudac. Jetra zbog toga jer je najaktivniji organ u metabolizmu kemikalija i jer je često ciljni organ za karcinogenost. Želudac zato jer je obično prvo mjesto kontakta s kemikalijama nakon unosa oralnim putem, iako bi i druge dijelove gastrointestinalnog trakta, poput duodenuma i jejunuma, trebalo isto tako smatrati mjestima kontakta koja su, kad je riječ o ljudima, možda bitnija od žljezdanog želuca štakora. Potrebno je pobrinuti se da takva tkiva ne budu izložena previsokim koncentracijama ispitivane kemikalije (21.). Ova se tehnika može u načelu primijeniti na svako tkivo iz kojeg se mogu dobiti suspenzije pojedinačnih stanica/jezgri koje je moguće analizirati. Vlasnički podaci nekoliko laboratorija pokazuju da se ona može uspješno primijeniti na nizu različitih tkiva te postoje brojne publikacije koje potvrđuju da se može primijeniti ne samo na jetru i želudac nego i na druge organe i tkiva, npr. jejunum (22.), bubrege (23., 24.), kožu (25., 26.), ili stanice iz mokraćnog mjehura (27., 28.), pluća i bronhoalveolarnog lavata (u slučaju ispitivanja kemikalija unesenih disanjem) (29., 30.); testovi su isto tako provedeni i na više organa istodobno (31., 32.).

Iako će se možda željeti istražiti genotoksični učinci na zametne stanice, treba napomenuti da se standardni alkalni komet-test koji je opisan u ovoj ispitnoj metodi ne smatra primjerenim za mjerenje lomova lanaca DNK u zrelim zametnim stanicama. S obzirom na to da su u pregledu literature o primjeni komet-testa u istraživanju genotoksičnosti na zametnim stanicama zabilježene visoke i promjenjive pozadinske razine kod oštećenja DNK (33.), smatra se potrebnim izmijeniti protokol te provesti poboljšane standardizacijske i validacijske studije prije nego što se u ispitnu metodu uključi komet-test na zrelim zametnim stanicama (npr. spermijima). Osim toga, preporučeni režim izlaganja koji je opisan u ovoj ispitnoj metodi nije optimalan pa bi stoga za smislenu analizu lomova lanaca DNK u zrelim spermijima bila potrebna dulja vremena izlaganja ili uzorkovanja. U literaturi su opisani genotoksični učinci izmjereni komet-testom u testikularnim stanicama u različitim fazama diferencijacije (34., 35.). Međutim, potrebno je napomenuti da spolne žlijezde sadržavaju mješavinu somatskih i zametnih stanica. Zbog toga pozitivni rezultati dobiveni za spolnu žlijezdu kao cjelinu (sjemenik) ne moraju nužno upućivati na oštećenje zametnih stanica; međutim, pokazuju da su ispitana kemikalija (ispitane kemikalije) i/ili njezini (njihovi) metaboliti došli u spolnu žlijezdu.

▼M7

U standardnim pokusnim uvjetima komet-testa ne mogu se pouzdano otkriti unakrsne veze. U određenim modificiranim pokusnim uvjetima mogla bi se otkriti unakrsna povezivanja DNK-DNK i DNK-protein te druge modifikacije baza poput oksidiranih baza (23., 36., 37., 38., 39.). Međutim, da bi se mogle na odgovarajući način utvrditi potrebne izmjene protokola, potreban je daljnji rad. Stoga, otkrivanje agensa odgovornih za stvaranje unakrsnih veza nije primarna svrha testa koji se ovdje opisuje. Ovaj test nije primjeren, čak ni uz izmjene, za otkrivanje aneugena.

S obzirom na trenutačne spoznaje, još je nekoliko ograničenja (vidjeti Dodatak 3.) povezano s komet-testom *in vivo*. Očekuje se da će u budućnosti ova ispitna metoda biti preispitana i ako bude potrebno, izmijenjena na temelju stečenog iskustva.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO METODE

Životinje se na odgovarajući način izlažu ispitivanoj kemikaliji. Detaljan opis doziranja i uzorkovanja naveden je u stavcima od 36. do 40. U izabrano vrijeme (vremena) uzorkovanja tkiva koja se želi analizirati diseciraju se te se pripremaju suspenzije pojedinačnih stanica/jezgri (može se izvesti *in situ* perfuzija ako se smatra korisnom, npr. za jetru), koje se potom uklapaju u agarozni gel kako bi se imobilizirale na predmetnom stakalcu. Stanice/jezgre obrađuju se puferom za lizu kako bi se uklonila stanična i/ili jezgrina membrana te se izlažu jakoj lužini, npr. pH $\geq$ 13 kako bi se omogućilo odmotavanje DNK i otpuštanje odmotanih petlji i fragmenata DNK. Potom se nuklearni DNK u agaru podvrgava elektroforezi. Normalne nefragmentirane molekule DNK ostaju na mjestu na kojemu se nuklearni DNK nalazio u agaru, a svi fragmenti DNK i odmotane petlje DNK kreću se prema anodi. Nakon elektroforeze DNK se vizualizira s pomoću odgovarajuće fluorescentne boje. Preparate bi trebalo analizirati s pomoću mikroskopa i automatskih ili poluautomatskih sustava za analizu slike. Stupanj migracije DNK tijekom elektroforeze i udaljenost migracije odražavaju količinu i veličinu fragmenata DNK. U komet-testu postoji nekoliko krajnjih točaka. Udio DNK u repu (% DNK u repu ili % intenziteta repa) preporučeni je parametar za procjenu oštećenja DNK (12., 40., 41., 42.). Nakon što se analizira dostatan broj jezgri, dobiveni se podaci analiziraju odgovarajućim metodama kako bi se protumačili rezultati testa.

Potrebno je napomenuti da provedena istraživanja upućuju na to da promjena pojedinih aspekata metodologije, uključujući pripremu uzoraka, uvjete elektroforeze, parametre vizualne analize (npr. intenzitet boje, intenzitet svjetlosti mikroskopske žarulje, upotreba filtera za mikroskop i dinamika kamere) te okolne uvjete (npr. pozadinsko osvjetljenje), može utjecati na migraciju DNK (43., 44., 45., 46.).

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Svaki bi laboratorij trebao utvrditi osposobljenost za izvođenje komet-testa dokazivanjem sposobnosti dobivanja dovoljno kvalitetnih suspenzija pojedinačnih stanica ili jezgri za svako ciljno tkivo ili tkiva svake upotrijebljene vrste. Kvaliteta preparata prvo se ocjenjuje prema postotku DNK u repu kometa za životinje tretirane nosačem, čije su vrijednosti unutar ponovljivog niskog raspona. Trenutačni podaci upućuju na to da skupinski srednji postotak DNK u repu kometa (na temelju srednje vrijednosti medijana – vidjeti stavak 57. za pojedinosti o ovim izrazima) u jetri štakora po mogućnosti ne bi trebao premašiti 6 %, što bi bilo u skladu s vrijednostima validacijskog ispitivanja koje je proveo JaCVAM (12.) te s drugim objavljenim i vlasničkim podacima. U ovom trenutku nema dovoljno podataka da bi se mogle dati preporuke o optimalnim ili prihvatljivim rasponima za druga tkiva. Time se ne isključuje mogućnost upotrebe drugih tkiva ako je

▼M7

takva upotreba opravdana. U izvješću o ispitivanju trebalo bi na odgovarajući način izvijestiti o provođenju komet-testa na tim tkivima pozivajući se na objavljenu literaturu ili vlasničke podatke. Prvo, da bi se dobio dovoljan dinamički raspon za otkrivanje pozitivnog učinka, poželjan je nizak raspon postotaka DNK u repu kometa u kontrolama. Drugo, svaki bi laboratorij trebao biti sposoban reproducirati očekivane odgovore za izravne mutagene i promutagene, s različitim načinima djelovanja kako su predloženi u tablici 1. (stavak 29.).

Pozitivne tvari mogu se izabrati primjerice iz validacijskog ispitivanja koje je proveo JaCVAM (12.) ili drugih objavljenih podataka (vidjeti stavak 9.), prema potrebi, uz obrazloženje te dokazujući jasne pozitivne odgovore u tkivima od interesa. Trebalo bi dokazati i sposobnost otkrivanja slabih učinaka poznatih mutagena, npr. EMS-a u malim dozama, na primjer utvrđivanjem odnosa između doze i odgovora na temelju odgovarajućeg broja doza i razmaka među dozama. Početna nastojanja trebala bi biti usredotočena na utvrđivanje osposobljenosti s najčešće upotrebljavanim tkivima, npr. jetrom glodavaca, za koja je moguće izvršiti usporedbu s postojećim podacima i očekivanim rezultatima (12.). Istodobno bi se mogli prikupiti i podaci za druga tkiva, npr. želudac/duodenum/jejunum, krv itd. Laboratorij treba dokazati osposobljenost na svakom tkivu svake vrste koju planira ispitivati te treba dokazati da se u tom tkivu može dobiti prihvatljiv pozitivni odgovor s poznatim mutagenom (npr. EMS-om).

Trebalo bi prikupiti podatke o kontroli s nosačem / negativnoj kontroli kako bi se dokazala obnovljivost negativnih odgovora te osiguralo da su tehnički aspekti testa ispravno kontrolirani ili ukazalo na potrebu za ponovnim utvrđivanjem raspona prijašnjih kontrola (vidjeti stavak 22.).

Potrebno je napomenuti da iako se više tkiva može prikupiti pri obdukciji te obraditi za analizu kometa, laboratorij mora biti osposobljen za izdvajanje različitih tkiva od jedne životinje, čime se osigurava da ni jedna eventualna lezija DNK neće biti zanemarena te da analiza kometa neće biti ugrožena. Duljina vremenskog intervala između eutanazije i uzimanja tkiva za obradu može biti od ključne važnosti (vidjeti stavak 44.).

Kod osposobljavanja za ovaj test mora se voditi računa o dobrobiti životinja te se stoga pri razvoju sposobnosti za različite aspekte testa mogu upotrijebiti tkiva životinja upotrijebljenih u drugim ispitivanjima. Nadalje, možda neće biti potrebno provesti cjelokupnu studiju tijekom faza uvođenja nove ispitne metode u laboratorij te se pri razvoju potrebnih vještina može upotrijebiti manji broj životinja ili ispitnih koncentracija.

Podaci o prijašnjim kontrolama

Tijekom istraživanja u svrhu dokazivanja tehničke osposobljenosti laboratorij bi trebao uspostaviti bazu s prijašnjim podacima kako bi mogao utvrditi raspone i distribucije vrijednosti pozitivnih i negativnih kontrola za odgovarajuća tkiva i vrste. Preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prijašnje podatke (tj. kriteriji prema kojima se podaci uključuju u bazu s prijašnjim podacima te isključuju iz nje, kao i kriteriji prihvatljivosti za određeni pokus) mogu se pronaći u literaturi (47.). Različita tkiva i različite vrste, kao i različiti nosači i putovi primjene, mogu u negativnim kontrolama dati različite vrijednosti postotaka DNK u repu. Stoga je važno utvrditi raspone vrijednosti negativnih kontrola

▼M7

za svako tkivo i vrstu. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode kontrole kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami (*C-charts*) ili X-stupčasti dijagrami (*X-bar charts*) (48.)), kako bi utvrdili varijabilnost svojih podataka te pokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom”. Za otkrivanje slabih učinaka (vidjeti stavak 17.) možda će isto tako biti potrebno optimizirati odabir odgovarajućih tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu, raspone doza i uvjete pokusa (npr. uvjete elektroforeze).

Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

OPIS METODE

Preparati

Odabir životinjske vrste

Obično se upotrebljavaju laboratorijske subpopulacije zdravih, mladih odraslih glodavaca (starih od 6 do 10 tjedana na početku tretiranja, iako su prihvatljive i nešto starije životinje). Odabir vrste glodavca trebao bi se temeljiti na: i. vrstama upotrijebljenima u drugim studijama toksičnosti (kako bi se podaci mogli povezivati i kako bi se omogućile integrirane studije), ii. vrstama kod kojih su se razvili tumori u studiji karcinogenosti (kada se istražuje mehanizam karcinogeneze) ili iii. vrstama čiji je metabolizam najbliži metabolizmu ljudi, ako su poznate. Za ovaj se test obično koriste štakori. Međutim, mogu se upotrijebiti i druge vrste ako je to etički i znanstveno opravdano.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

Ako je riječ o glodavcima, temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje u idealnom bi slučaju trebala biti 22 °C (± 3 °C). Relativna vlaga trebala bi u idealnom slučaju iznosi od 50 do 60 %., pri čemu bi trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prijeđe 70 % osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na odabir hrane može utjecati to što se mora osigurati da se ispitivana kemikalija u hranu dobro umiješa kada se daje tim putem. Glodavce bi trebalo držati u manjim skupinama (obično ne više od pet jedinki) istog spola ako se ne očekuje agresivno ponašanje. Životinje se mogu držati u zasebnim kavezima samo ako je to znanstveno opravdano. Kad god je moguće, trebalo bi upotrijebiti pune podove jer rešetkasti podovi mogu uzrokovati teške ozljede (49.). Mora se osigurati odgovarajuće obogaćivanje okoliša.

Priprema životinja

Životinje se nasumično raspoređuju u kontrolne skupine i skupine koje će se tretirati. Životinje se pojedinačno označuju jedinstvenim oznakama te se prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana prije početka tretiranja. Za pojedinačno označivanje životinja mora se primijeniti metoda koja je najmanje invazivna. Primjerene su metode prstenovanje, stavljanje privjesnica, mikročipiranje i biometrijska identifikacija. Obrezivanje prstiju ili ušiju nije znanstveno opravdano u ovim testovima. Kaveze treba rasporediti na način da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Na početku studije variranje tjelesne mase životinja treba biti što manje i ne smije prelaziti ± 20 %.

Priprema doza

Prije no što se doza daje životinjama, krute ispitivane kemikalije trebalo bi otopiti ili suspendirati u odgovarajućim nosačima ili umiješati u hranu ili vodu za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. U slučaju izloženosti udisanjem ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima (50., 51.).

Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

▼M7

Uvjeti ispitivanja

Nosač

Pri visinama doza koje se upotrebljavaju nosač ne smije imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanim kemikalijama. Ako se upotrebljavaju nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima koji pokazuju njihovu kompatibilnost s pokusnim životinjama, putom primjene i krajnjom točkom koja se mjeri. Kad god je to moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača. Treba napomenuti da neki nosači (posebno viskozni nosači) mogu izazvati upalu i povećati pozadinske razine lomova lanaca DNK na mjestu kontakta, posebno u slučaju višekratne primjene.

Kontrole

Pozitivne kontrole

Za sada bi u svako ispitivanje trebalo uključiti skupinu od najmanje tri životinje jednog spola koje je moguće analizirati, ili svakog spola ako se oba spola koriste (vidjeti stavak 32.), koje se tretiraju s tvari koja se upotrebljava za pozitivnu kontrolu. U budućnosti će možda biti moguće dokazati da je tehnička osposobljenost takva da omogućuje smanjenje broja pozitivnih kontrola. Ako se primjenjuje višekratno uzorkovanje (npr. u slučaju protokola koji obuhvaća jednokratnu primjenu), pozitivne je kontrole potrebno uključiti samo za jedno od tih uzorkovanja, pri čemu bi to trebalo izvesti prema uravnoteženom planu (vidjeti stavak 48.). Tvari koje se upotrebljavaju za istodobne pozitivne kontrole nije neophodno primjenjivati istim putem kao i ispitivanu kemikaliju, iako je važno upotrijebiti isti put primjene kada se mjere učinci na mjestu kontakta. Trebalo bi dokazati da tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu izazivaju lomove lanaca DNK u svim tkivima na koje se odnosi ispitivana kemikalija te će EMS vjerojatno biti izabrana pozitivna kontrola jer je izazvao lomove lanaca DNK u svim tkivima koja su istraživana. Doze tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu trebalo bi odabrati tako da proizvode umjerene učinke kojima se kritički procjenjuju rezultati i osjetljivost analize te bi se mogle temeljiti na krivulji doza – odgovor koju je laboratorij utvrdio tijekom dokazivanja tehničke osposobljenosti. Postotak DNK u repu kometa kod životinja u istodobnim pozitivnim kontrolama trebao bi biti u skladu s rasponom koji je laboratorij prethodno utvrdio za svako pojedino tkivo i vrijeme uzorkovanja za predmetnu vrstu (vidjeti stavak 16.). Primjeri tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu i nekih njihovih ciljnih tkiva (u glodavaca) navedeni su u tablici 1. Mogu se odabrati i tvari koje nisu navedene u tablici 1. ako je to znanstveno opravdano.

Tablica 1.:

Primjeri tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu i nekih njihovih ciljnih tkiva

Tvari i CAS br.
Etil metansulfonat (CAS br. 62-50-0) za sva tkiva
Etil nitrozoureja (CAS br. 759-73-9) za jetru i želudac, duodenum ili jejunum
Metil metansulfonat (CAS br. 66-27-3) za jetru, želudac, duodenum ili jejunum, stanice plućnog i bronhoalveolarnog lavata, bubrege, mjehur, pluća, sjemenike i koštanu srž/krv
N-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozogvanidin(CAS br. 70-25-7) za želudac, duodenum ili jejunum
1,2-dimetilhidrazin 2HCl (CAS br. 306-37-6) za jetru i crijeva
N-metil-*N*-nitrozoureja (CAS br. 684-93-5) za jetru, koštanu srž, krv, bubrege, želudac, jejunum i mozak.

▼M7

Negativne kontrole

U svaki bi test za svako vrijeme uzorkovanja i svako tkivo trebalo uključiti skupinu životinja za negativnu kontrolu, kojima se daje samo nosač, a inače se tretiraju na jednak način kao i skupine koje se izlažu ispitivanoj kemikaliji. Postotak DNK u repu kometa kod životinja u negativnim kontrolama trebao bi biti unutar referentnog raspona koji je laboratorij prethodno utvrdio za svako pojedino tkivo i vrijeme uzorkovanja za predmetnu vrstu (vidjeti stavak 16.). U nedostatku prijašnjih ili objavljenih podataka o kontrolama kojima se dokazuje da odabrani nosač, broj primjena ili put primjene ne izazivaju štetne i genotoksične učinke trebalo bi prije izvođenja potpune studije provesti preliminarna istraživanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

Iako postoji malo podataka o ženkama na temelju kojih bi se mogle izvršiti usporedbe među spolovima u vezi s komet-testom, u drugim ispitivanjima genotoksičnosti *in vivo* dobiveni su općenito slični odgovori kod mužjaka i ženki te bi se stoga većina ispitivanja mogla provesti na životinjama bilo kojeg spola. Podaci koji ukazuju na značajne razlike između mužjaka i ženki (npr. razlike u sustavnoj toksičnosti, metabolizmu, bioraspoloživosti itd., uključujući podatke iz studija za određivanje raspona) potiču upotrebu obaju spolova. U tom slučaju može biti primjereno provesti istraživanje na oba spola, npr. u okviru istraživanja toksičnosti uz primjenu ponovljenih doza. Ako se upotrebljavaju oba spola, bilo bi primjereno primijeniti faktorski model. U Dodatku 2. navedeni su detalji o načinu analize podataka primjenom tog modela.

Na početku istraživanja (i tijekom utvrđivanja tehničke osposobljenosti) skupine bi trebale biti takve da u svakoj od njih ima najmanje pet životinja jednog spola koje je moguće analizirati ili svakog spola ako se oba spola upotrebljavaju (manji broj u skupini koja služi za paralelnu pozitivnu kontrolu – vidjeti stavak 29.). U slučajevima kad izloženost ljudi nekoj kemikaliji može biti vezana uz spol, kao što je slučaj s nekim farmaceutskim sredstvima, ispitivanje bi trebalo obaviti na životinjama odgovarajućeg spola. Što se tiče maksimalnog broja potrebnih životinja, u pravilu bi za studiju koja se provodi u skladu s parametrima utvrđenima u stavku 33. s tri skupine koje se tretiraju te istodobnim negativnim i pozitivnim kontrolama (svaka skupina sastavljena od pet životinja istog spola) trebalo od 25 do 35 životinja.

PLAN TRETIRANJA

Životinje bi trebale dobiti dnevne doze u razdoblju od dva ili više dana (tj. dvije ili više doza u vremenskim razmacima od oko 24 sata), a uzorke bi trebalo prikupiti jednom od 2 do 6 sati (ili u T_{max}) nakon posljednjeg tretiranja (12.). Prihvatljivi su uzorci uzeti nakon primjene produženog režima doziranja (npr. dnevne doze tijekom 28 dana). Dokazano je da se komet-test može uspješno kombinirati s mikronukleus-testom na eritrocitima (10., 19.). Međutim, potrebno je pomno razmotriti logistiku potrebnu za uzorkovanje tkiva za komet-test poštujući istodobno i zahtjeve u pogledu uzorkovanja tkiva za druge vrste toksikoloških procjena. Izdvajanje 24 sata nakon posljednje doze, koje je tipično za opće studije toksičnosti, u većini slučajeva nije primjereno (vidjeti stavak 40. o vremenu uzorkovanja). Opravdanost primjene drugih rasporeda tretiranja i uzorkovanja treba dokazati (vidjeti Dodatak 3.). Moglo bi se, na primjer, primijeniti jednokratno tretiranje s višekratnim uzorkovanjem, ali trebalo bi napomenuti da istraživanje s jednokratnom primjenom zahtijeva veći broj životinja jer je potreban veći broj uzimanja uzoraka; ovo rješenje ponekad može biti poželjno, npr. kada ispitivana kemikalija izaziva pretjeranu toksičnost nakon ponovljenih primjena.

▼M7

Bez obzira na način na koji se ispitivanje provodi, prihvatljivo je ako ispitivana kemikalija daje pozitivan odgovor ili u slučaju negativnih rezultata ako je dokazano postojanje izravnih ili neizravnih dokaza o izloženosti ciljnog tkiva (ciljnih tkiva) ili toksičnosti za to tkivo (ta tkiva) ili ako je dosegnuta granična doza (vidjeti stavak 36.).

Isto se tako ispitivane kemikalije mogu primijeniti kao podijeljena doza, odnosno doza koja se primjenjuje u dva puta tijekom istog dana u razmaku od najviše dva do tri sata, kako bi se olakšala primjena velike količine materijala. U tim bi okolnostima vrijeme uzorkovanja trebalo odrediti na temelju vremena davanja posljednje doze (vidjeti stavak 40.).

Visine doza

Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona doza jer nisu dostupni prikladni podaci iz drugih relevantnih istraživanja koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, subpopulacije, spola i režima tretiranja koji će se primijeniti u glavnom istraživanju u skladu s važećim načelima provođenja istraživanja za određivanje raspona doza. Tim bi se istraživanjem trebala odrediti najviša prihvatljiva doza (MTD – *maximum tolerated dose*), koja se definira kao doza koja izaziva blage toksične učinke povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, jasne kliničke znakove poput neuobičajenog ponašanja ili reakcija, manji gubitak tjelesne mase ili citotoksičnosti u ciljnom tkivu), ali ne izaziva smrt ili znakove boli, patnje ili stresa zbog kojih bi životinju trebalo eutanazirati. Za netoksičnu ispitivanu kemikaliju koja se daje u razdoblju od 14 ili više dana najviša (granična) doza je 1 000 mg/kg tjelesne mase/dan. Za razdoblja primjene kraća od 14 dana najviša (granična) doza je 2 000 mg/kg tjelesne mase/dan. Za neke vrste ispitivanih kemikalija (npr. lijekove za ljude) koje su obuhvaćene posebnim propisima te granične vrijednosti mogu biti drukčije.

Kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava ili induciraju detoksifikacijske procese koji mogu dovesti do smanjene izloženosti nakon dugotrajne primjene mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.

Za akutne i subakutne verzije komet-testa, osim najviše doze (MTD, najveća moguća doza, maksimalna izloženost ili granična doza) za svako vrijeme uzorkovanja trebalo bi odabrati i dodatan niz sve nižih doza, najmanje dvije, s odgovarajućim razmakom između njihovih visina (koji će po mogućnosti biti manji od 10) kako bi se pokazali odgovori povezani s dozom. Međutim, upotrijebljene visine doza trebale bi po mogućnosti obuhvatiti i raspon od maksimalne do male ili nikakve toksičnosti. Ako se pri svim ispitanim visinama doza opaze toksični učinci na ciljnom tkivu, savjetuje se provesti dodatno istraživanje s netoksičnim dozama (vidjeti stavke 54. do 55.). Studije čija je svrha cjelovitije istražiti oblik krivulje doza – odgovor mogu zahtijevati jednu ili više dodatnih skupina doza.

Primjena doza

Pri planiranju analize u obzir bi trebalo uzeti očekivani način ljudske izloženosti. Stoga se, ako su opravdani, mogu izabrati putovi primjene poput unosa hranom, vodom za piće, lokalnom primjenom, potkožno, intravenozno, oralno (sondom), udisanjem, intratrahealno ili implantacijom. U svakom bi slučaju odabrani put trebao biti takav da se osigura odgovarajuća izloženost ciljnog tkiva (ciljnih tkiva). Intraperitonealno ubrizgavanje u pravilu se ne preporučuje jer nije tipičan relevantni put izloženosti ljudi te bi ga trebalo upotrebljavati jedino ako za to postoji posebno opravdanje (npr. za neke tvari koje se upotrebljavaju za pozitivnu kontrolu, u istraživačke svrhe ili za neke lijekove koji se daju intraperitonealno). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti sondom ili injekcijom ovisi o veličini pokusne životinje. Taj volumen ne smije

▼M7

biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Opravdanost primjene većih volumena od navedenog (ako je dopuštena zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba dokazati. Kad god je moguće, različite visine doza trebalo bi postići prilagođavanjem koncentracije formulacije za doziranje kako bi se kod svih visina doze osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Vrijeme uzorkovanja

Vrijeme uzorkovanja kritična je varijabla jer ovisi o vremenu koje je potrebno da ispitivane kemikalije postignu maksimalnu koncentraciju u ciljnom tkivu te da dođe do indukcije lomova lanaca DNK, a mora se dogoditi prije nego što se ti lomovi uklone, poprave ili izazovu smrt stanice. Neke lezije koje dovode do lomova lanaca DNK koji se otkrivaju komet-testom mogu trajati vrlo kratko, barem za neke kemikalije ispitane *in vitro* (52., 53.). Stoga, ako se sumnja na takve prolazne lezije DNK, trebalo bi poduzeti mjere kako bi se ograničio njihov gubitak tako što se osigurava da se tkiva uzorkuju dovoljno rano, po mogućnosti prije zadanih rokova navedenih u nastavku. Optimalno vrijeme uzorkovanja može ovisiti o kemikaliji ili putu primjene, što za posljedicu ima, na primjer, brzo izlaganje tkiva intravenoznom primjenom ili inhalacijom. Shodno tome, vremena uzorkovanja trebalo bi odrediti na temelju kinetičkih podataka, ako su dostupni, (npr. vrijeme (T_{max}) pri kojem se postiže vršna koncentracija u plazmi ili tkivu (C_{max}) ili pri stabilnom stanju u slučaju višekratne primjene). U nedostatku kinetičkih podataka, odgovarajući kompromis za mjerenje genotoksičnosti jest uzorkovati od 2 do 6 sati nakon posljednjeg tretiranja u slučaju dvaju ili više tretiranja, ili od 2 do 6 i od 16 do 26 sati nakon jednokratne primjene, iako bi trebalo paziti da sve životinje budu obducirane u isto vrijeme nakon posljednje (ili jedine) doze. Odgovarajuće vrijeme uzorkovanja može se odabrati i na temelju informacija o izgledu toksičnih učinaka u ciljnim organima (ako su dostupne).

Zapažanja

Opća klinička opažanja zdravlja životinja trebalo bi provoditi i evidentirati najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon primjene doze (54.) Najmanje dva puta dnevno treba provjeravati ima li slučajeva pobolijevanja ili smrti životinja. Kod istraživanja duljeg trajanja sve bi životinje trebalo vagati barem jednom tjedno te na kraju razdoblja ispitivanja. Unos hrane trebalo bi mjeriti pri svakom obnavljanju hrane i najmanje jednom tjedno. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno trebalo bi mjeriti i unos vode. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekomjerne toksičnosti trebale bi se eutanazirati prije dovršetka ispitnog razdoblja i u pravilu se ne upotrebljavaju za komet-test.

Prikupljanje tkiva

Budući da je indukciju lomova lanaca DNK (kometa) moguće proučavati u gotovo bilo kojem tkivu, razlozi za odabir tkiva koje je potrebno prikupiti trebali bi biti jasno definirani i temeljiti se na razlogu za provođenje istraživanja i svim postojećim podacima o ADME-u, genotoksičnosti, karcinogenosti ili drugim podacima o toksičnosti za kemikalije koje se istražuju. Važni čimbenici koje treba uzeti u obzir trebali bi uključivati put primjene (na temelju vjerojatnog puta (putova) izloženosti ljudi), predviđenu tkivnu distribuciju i apsorpciju, ulogu metabolizma i moguće mehanizme djelovanja ispitivanih kemikalija. Jetra je najčešće proučavano tkivo i za nju postoji najviše podataka. Stoga, u nedostatku osnovnih informacija te ako ne postoje razlozi za odabir nekog točno određenog tkiva, opravdano je uzorkovati jetru jer je ona primarno mjesto ksenobiotičkog metabolizma i često je u velikoj mjeri izložena kako izvornoj tvari (tvarima) tako

▼M7

i njezinu metabolitu (metabolitima). U nekim slučajevima može biti najrelevantnije ispitati mjesto izravnog dodira (na primjer, žljezdani želudac ili duodenum/jejunum ako je riječ o kemikalijama koje se daju oralnim putem, ili pluća ako je riječ o inhaliranim kemikalijama). Dodatna ili alternativna tkiva trebalo bi odabrati uzimajući u obzir konkretne razloge zbog kojih se ispitivanje provodi, ali može biti korisno ispitati više tkiva iste životinje pod uvjetom da je laboratorij dokazao da je osposobljen za rad s tim tkivima te da je u stanju obrađivati više tkiva u isto vrijeme.

Priprema uzoraka

Za postupke opisane u sljedećim stavcima (44. do 49.) važno je da sve otopine ili stabilne suspenzije budu upotrijebljene prije isteka njihove valjanosti ili da budu svježe pripremljene ako je potrebno. U sljedećim stavcima, isto tako, vremena potrebna za i. uzimanje svakog tkiva nakon obdukcije, ii. obradu svakog tkiva da bi se dobile suspenzije stanica/jezgri te iii. obradu suspenzije i pripremu predmetnih stakalaca smatraju se kritičnim varijablama (vidjeti definicije, Dodatak 1.) te bi prihvatljivo trajanje svake od tih etapa trebalo odrediti tijekom uspostavljanja metode i dokazivanja tehničke osposobljenosti.

Životinje se eutanaziraju, u skladu s važećim zakonodavstvom o dobrobiti životinja i načelima 3R, u odgovarajućem trenutku (trenucima) nakon zadnje primjene ispitivane kemikalije. Odabrano se tkivo uklanja (odabrana se tkiva uklanjaju), disecira (diseciraju) te se dio uzima za komet-test, pri čemu bi se istodobno trebao uzeti isječak iz istog dijela tkiva te staviti u otopinu formaldehida ili odgovarajući fiksativ za eventualnu histopatološku analizu (vidjeti stavak 55.) u skladu sa standardnim metodama (12.). Tkivo za komet-test stavlja se u pufer za usitnjavanje, pomno se ispere hladnim puferom za usitnjavanje kako bi se uklonila rezidualna krv te se do obrade čuva u izrazito ledenom puferu za usitnjavanje. Može se isto tako izvesti *in situ* perfuzija, npr. za jetru, bubrege.

Objavljen je veliki broj metoda izoliranja stanica/jezgri. One uključuju usitnjavanje tkiva poput jetre i bubrega, struganje mukozne površine u slučaju gastrointestinalnog trakta, homogenizaciju i enzimsku digestiju. U validacijskom ispitivanju koje je proveo JaCVAM proučavane su samo izolirane stanice pa je stoga u smislu uspostavljanja metode i upućivanja na podatke iz ispitivanja koje je proveo JaCVAM tijekom dokazivanja tehničke osposobljenosti poželjno upotrijebiti izolirane stanice. Međutim, pokazalo se da se rezultat testa ne razlikuje bitno bez obzira na to jesu li upotrijebljene izolirane stanice ili jezgre (8.). Isto tako, različite metode izoliranja stanica/jezgri (npr. homogenizacija, usitnjavanje, enzimska digestija i filtriranje kroz mrežicu) dale su usporedive rezultate (55.). Stoga se mogu upotrijebiti izolirane stanice ili izolirane jezgre. Laboratorij bi trebao temeljito ocijeniti i validirati metode izoliranja pojedinačnih stanica/jezgri koje su specifične za pojedino tkivo. Kao što je navedeno u stavku 40., neke lezije koje dovode do lomova lanaca DNK koji se otkrivaju komet-testom mogu trajati vrlo kratko (52., 53.). Stoga, neovisno o tome koja se metoda upotrebljava za pripremu suspenzija pojedinačnih stanica/jezgri, važno je tkiva obraditi što je prije moguće nakon eutanazije životinja te ih smjestiti u uvjete kojima se smanjuje nestanak lezija (npr. držati tkiva na niskoj temperaturi). Sve dok ne budu spremne za upotrebu, suspenzije stanica trebalo bi držati na vrlo niskoj temperaturi kako bi se mogle dokazati minimalne varijacije među uzorcima i odgovarajući odgovori kod pozitivnih i negativnih kontrola.

▼M7

PRIPREMA PREDMETNIH STAKALACA

Predmetna stakalca trebalo bi pripremiti što je prije moguće (idealno bi bilo u roku od jednog sata) nakon pripreme pojedinačnih stanica/jezgri, ali bi temperaturu i vrijeme između smrti životinje i pripreme predmetnih stakalaca trebalo strogo kontrolirati i validirati u uvjetima laboratorija. Volumen stanične suspenzije koji se dodaje agarozi niskog tališta (obično od 0,5 do 1,0 %) kako bi se pripremila predmetna stakalca ne bi smio sniziti postotak agaroze niskog tališta na manje od 0,45 %. Optimalna gustoća stanica određuje se sustavom za analizu slike koji se upotrebljava za brojanje kometa.

Liza

Uvjeti liziranja isto su tako kritična varijabla i mogu utjecati na lomove lanaca koji nastaju zbog specifičnih vrsta modifikacije DNK (alkilacije i stvaranja adukata na bazama DNK). Stoga se preporučuje održavati uvjete liziranja konstantnima koliko je god moguće za sva predmetna stakalca unutar pokusa. Nakon pripreme predmetna stakalca trebalo bi namakati u rashlađenoj otopini za lizu najmanje jedan sat (ili preko noći) na oko 2 do 8 °C pod prigušenim svjetlom, npr. žutim svjetlom (ili u svjetlonepropusnim uvjetima) kako bi se izbjeglo izlaganje bijelom svjetlu koje može sadržavati UV komponente. Nakon tog razdoblja inkubacije predmetna stakalca trebalo bi isprati kako bi se uklonili ostaci deterdženta i soli prije faze alkalnog odmatanja. To se može učiniti s pomoću pročišćene vode, pufera za neutralizaciju ili fosfatnog pufera. Može se upotrijebiti i pufer za elektroforezu. Time će se održavati alkalni uvjeti u komori za elektroforezu.

Odmatanje i elektroforeza

Predmetna stakalca trebalo bi nasumice postaviti na platformu uređaja za elektroforezu na uronjenom gelu (engl. *submarine-type electrophoresis*) koji sadržava dovoljno otopine za elektroforezu da u cijelosti prekrije površinu predmetnih stakalaca (visina pokrivajućeg sloja trebala bi stalno biti ista u svim analitičkim ciklusima). Kod drugih vrsta uređaja za elektroforezu koji se upotrebljavaju u komet-testu, npr. s aktivnim hlađenjem, cirkulacijom i visokonaponskim izvorom napajanja, jačina električne struje bit će veća što je pokrivajući sloj otopine viši, dok će napon ostati isti. Predmetna stakalca trebalo bi postaviti u kadicu za elektroforezu na uravnotežen način kako bi se ublažili učinci eventualnih tendencija ili efekt ruba unutar kadice te smanjila varijabilnost među šaržama, tj. u svakom ciklusu elektroforeze trebao bi biti jednak broj predmetnih stakalaca s materijalom od svake životinje koja se upotrebljava u istraživanju te bi trebalo uključiti i uzorke različitih skupina doza te negativne i pozitivne kontrole. Predmetna stakalca trebalo bi držati u kadici najmanje 20 minuta kako bi se odmotao DNK te ih potom podvrgnuti elektroforezi u kontroliranim uvjetima kojima se maksimiziraju osjetljivost i dinamički raspon testa (tj. koji dovode do prihvatljivih postotaka DNK u repu kometa, kod pozitivnih i negativnih kontrola, kojima se osigurava maksimalna osjetljivost). Stupanj migracije DNK linearno je povezan s trajanjem elektroforeze, kao i s potencijalom (V/cm). Prema ispitivanju koje je proveo JaCVAM, to bi moglo biti 0,7 V/cm tijekom najmanje 20 minuta. Trajanje elektroforeze smatra se kritičnom varijablom te bi vrijeme elektroforeze trebalo odrediti tako da se osigura optimalan dinamički raspon. Dulje

▼M7

trajanje elektroforeze (npr. 30 ili 40 minuta radi maksimiziranja osjetljivosti) obično dovodi do jačih pozitivnih reakcija s poznatim mutagenima. Međutim, dulje trajanje elektroforeze može dovesti i do pretjerane migracije u kontrolnim uzorcima. U svakom bi pokusu trebalo održavati stalan napon, a varijabilnost ostalih parametara trebala bi biti unutar uskog i specificiranog raspona, na primjer u ispitivanju koje je proveo JaCVAM uz 0,7 V/cm postignuta je početna struja od 300 mA. Dubinu pufera trebalo bi prilagoditi tako da se postignu željeni uvjeti i trebalo bi je održavati tijekom cijelog pokusa. Trebalo bi zabilježiti intenzitet struje na početku i na kraju razdoblja elektroforeze. Optimalne bi uvjete stoga trebalo odrediti tijekom početnog dokazivanja tehničke osposobljenosti predmetnog laboratorija za svako tkivo koje se ispituje. Temperaturu otopine za elektroforezu tijekom odmotavanja i elektroforeze trebalo bi održavati na niskoj razini, obično na 2 do 10 °C (10.). Trebalo bi zabilježiti temperaturu otopine za elektroforezu na početku odmotavanja, na početku elektroforeze i na kraju elektroforeze.

Po završetku elektroforeze predmetna stakalca trebalo bi namakati/ispirati u puferu za neutralizaciju najmanje pet minuta. Gelovi se mogu obojiti i pregledati u „svježem” stanju (npr. unutar jednog do dva dana) ili ih se može dehidrirati za kasnije pregledavanje (npr. unutar jednog do dva tjedna nakon bojenja) (56.). Međutim, navedene bi uvjete trebalo validirati tijekom dokazivanja tehničke osposobljenosti te bi trebalo prikupiti prijašnje podatke i odvojeno ih čuvati za svaki od tih uvjeta. U tom drugom slučaju, predmetna stakalca trebalo bi dehidrirati namakanjem u apsolutnom etanolu najmanje pet minuta, ostaviti da se osuše na zraku te do pregledavanja čuvati na sobnoj temperaturi ili u spremniku pohranjenom u hladnjaku.

Metode mjerenja

Kvantitativnu analizu kometa trebalo bi izvršiti s pomoću automatskog ili poluautomatskog sustava za analizu slike. Predmetna stakalca boje se odgovarajućom fluorescentnom bojom, npr. bojom SYBR Gold, Green I, propidijevim jodidom ili etidijevim bromidom te se mjere pod prikladnim povećanjem (npr. 200×) s pomoću epifluorescentnog mikroskopa opremljenog odgovarajućim detektorima ili digitalnom kamerom (npr. CCD).

Stanice se mogu razvrstati u tri kategorije opisane u atlasu slika kometa (57.), i to u kategoriju mjerljivih, nemjerljivih i „fantomskih” stanica (*hedgehog*) (za detalje vidjeti stavak 56.). Kako bi se izbjegli artefakti, postotak DNK u repu trebalo bi mjeriti samo u mjerljivim stanicama (koje imaju jasno definiranu glavu i rep bez ikakve interferencije sa susjednim stanicama). Nije potrebno izvijestiti o učestalosti nemjerljivih stanica. Učestalost fantomskih stanica trebalo bi odrediti i odvojeno dokumentirati na temelju vizualnog pregleda (jer nedostatak jasno definirane glave znači da se stanice ne mogu dobro otkriti s pomoću sustava za analizu slike) najmanje 150 stanica po uzorku (za detalje vidjeti stavak 56.).

Sva predmetna stakalca za analizu, uključujući i one za pozitivne i negativne kontrole, trebalo bi neovisno kodirati i pregledati „na slijepo” tako da analitičar ne zna uvjete tretiranja. Za svaki bi uzorak (po tkivu po životinji) trebalo analizirati barem 150 stanica (isključujući fantomske stanice – vidjeti stavak 56.). Pregledavanjem 150 stanica po životinji kod najmanje pet životinja po dozi (ali manje od pet u skupini koja služi kao istodobna pozitivna kontrola – vidjeti stavak 29.) osigurava se odgovarajuća statistička snaga prema analizi koju su proveli Smith *et al*., 2008. (5.). Ako se upotrebljavaju predmetna stakalca, to bi značilo pregledavanje dvaju ili triju predmetnih stakalaca po uzorku ako se upotrebljava pet životinja po skupini. Trebalo bi pregledati nekoliko površina predmetnog stakalca pri gustoći koja osigurava da nema preklapanja repova kometa. Trebalo bi izbjegavati pregledavanje na rubovima predmetnih stakalaca.

Lomovi lanaca DNK u komet-testu mogu se izmjeriti prema neovisnim parametrima kao što su postotak DNK u repu, duljina repa i repni moment. Ako se upotrebljava odgovarajući računalni program za analizu slike, mogu se izvršiti sva tri mjerenja. Međutim, za ocjenjivanje i tumačenje rezultata preporučuje se postotak DNK u repu (poznat i kao intenzitet repa) (12., 40., 41., 42.), koji je određen intenzitetom fragmenata DNK u repu izraženom kao postotak ukupnog intenziteta stanice (13).

▼M7

Oštećenje tkiva i citotoksičnost

Pozitivni nalazi u komet-testu ne moraju biti isključivo posljedica genotoksičnosti jer i toksičnost za ciljna tkiva može isto tako dovesti do povećanja migracije DNK (12., 41.). Nasuprot tome, u slučaju poznatih genotoksičnih tvari često se uočava niska ili umjerena citotoksičnost (12.), što pokazuje da komet-test sam po sebi ne omogućuje razlikovanje migracije DNK koju je inducirala genotoksičnost od one koju je inducirala citotoksičnost. Međutim, uoči li se povećanje migracije DNK, preporučuje se ispitati jedan ili više pokazatelja citotoksičnosti jer to može pomoći u tumačenju nalaza. Povećanje migracije DNK u prisutnosti jasnih dokaza o citotoksičnosti potrebno je tumačiti s oprezom.

Predložena su mnoga mjerila citotoksičnosti, od kojih se histopatološke promjene smatraju relevantnim mjerilom tkivne toksičnosti. Zapažanja poput upale, infiltracije stanica, apoptotskih ili nekrotskih promjena povezana su s povećanom migracijom DNK; međutim, kako je pokazalo validacijsko ispitivanje što ga je proveo JaCVAM (12.), ne postoji konačan popis histopatoloških promjena koje su uvijek povezane s povećanom migracijom DNK. Promjene u parametrima kliničke kemije (npr. AST, ALT) mogu isto tako pružiti korisne informacije o oštećenju tkiva te se mogu razmotriti i dodatni pokazatelji poput aktivacije kaspaze, obilježavanja apoptotičkih stanica metodom TUNEL, obojenosti aneksinom V itd. Međutim, objavljeni podaci o upotrebi tih pokazatelja u istraživanjima *in vivo* ograničeni su i nisu svi jednako pouzdani.

Fantomske stanice (*hedgehogs, clouds, ghost cells*) jesu stanice na čijoj se mikroskopskoj slici vidi mala glava, ili glava ne postoji, i veliki difuzni rep te se smatraju teško oštećenim stanicama, iako nije moguće sa sigurnošću odrediti njihovu etiologiju (vidjeti Dodatak 3.). Zbog izgleda fantomskih stanica mjerenje postotka DNK u repu s pomoću analize slike nije pouzdano te bi stoga takve stanice trebalo ocijeniti odvojeno. Pojavu fantomskih stanica trebalo bi zabilježiti i navesti u izvješću, a svako relevantno povećanje za koje se smatra da je uzrokovano ispitivanom kemikalijom trebalo bi istražiti i tumačiti s oprezom. Poznavanje potencijalnog načina djelovanja ispitivanih kemikalija može pomoći pri tim razmatranjima.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

S obzirom na to da je životinja pokusna jedinica, trebalo bi navesti podatke za pojedinačne životinje i sažetak rezultata u obliku tablice. Zbog hijerarhijske prirode podataka preporučuje se odrediti medijan postotka DNK u repu za svako predmetno stakalce te izračunati srednju vrijednost medijana za svaku životinju (12.). Potom se određuje srednja vrijednost pojedinačnih srednjih vrijednosti dobivenih za životinje kako bi se dobila srednja vrijednost za skupinu. Sve te vrijednosti trebalo bi navesti u izvješću. Mogu se primijeniti i alternativni pristupi (vidjeti stavak 53.) ako su znanstveno i statistički opravdani. Za statističku analizu mogu se primijeniti različiti pristupi (58., 59., 60., 61.). Pri odabiru statističkih metoda trebalo bi uzeti u obzir potrebu za eventualnim pretvaranjem podataka (npr. u logaritme ili kvadratne korijene) i/ili dodavanjem malog broja (npr. 0,001) svim vrijednostima (čak i nultima) kako bi se ublažili učinci nultih staničnih vrijednosti, kako je objašnjeno u literaturi na koju se upućuje prethodno u tekstu. U Dodatku 2. navedeni su detalji o analizi interakcija između tretiranja i spolova u slučaju kada se upotrebljavaju oba spola te o naknadnoj analizi podataka ovisno o tome jesu li ili nisu utvrđene razlike. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima.

Kriteriji prihvatljivosti

Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:

a. istodobna negativna kontrola smatra se prihvatljivom za dodavanje u laboratorijsku bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama kako je opisano u stavku 16.;

▼M7

b. istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 29.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s onima koji su dobiveni u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama te uzrokovati statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom;

c. analiziran je odgovarajući broj stanica i doza (stavak 52. i stavci od 36. do 38.);

d. kriteriji za odabir najveće doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavku 36.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

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

a. najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom;

b. odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s dozom;

c. bilo koji od rezultata nalazi se izvan raspona distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama za određenu vrstu, nosač, put primjene, tkivo i broj primjena.

Ako su svi navedeni kriteriji ispunjeni, smatra se da je ispitivana kemikalija sposobna uzrokovati lomove lanaca DNK u tkivima koja se proučavaju u tom ispitnom sustavu. Ako su ispunjeni samo jedan ili dva navedena kriterija, vidjeti stavak 62.

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

a. ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički znatno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

b. odgovarajući test trenda pokazuje da ne postoji povećanje povezano s koncentracijom,

c. svi se rezultati nalaze unutar raspona distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama za određenu vrstu, nosač, put primjene, tkivo i broj primjena,

d. dokazano je postojanje izravnih ili neizravnih dokaza o izloženosti ciljnog tkiva (ciljnih tkiva) ili toksičnosti za to tkivo (ta tkiva).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija nije sposobna uzrokovati lomove lanaca DNK u tkivima koja se proučavaju u tom ispitnom sustavu.

Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

U slučaju kada odgovor nije ni jasno negativan niti jasno pozitivan (tj. nisu ispunjeni svi kriteriji koji su navedeni u stavku 59. ili 60.) te kako bi se utvrdila biološka relevantnost rezultata, podatke bi trebalo ocijeniti stručnom prosudbom i/ili bi trebalo provesti dodatna istraživanja ako je to znanstveno opravdano. Moglo bi biti korisno pregledati dodatne stanice (prema potrebi) ili ponoviti pokus s eventualno optimiziranim pokusnim uvjetima (npr. razmak između doza, drugi putovi primjene, druga vremena uzorkovanja ili druga tkiva).

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

▼M7

Da bi se procijenila biološka relevantnost pozitivnog ili dvosmislenog rezultata, potrebne su informacije o citotoksičnosti za ciljno tkivo (vidjeti stavke od 54. do 55.). Ako se pozitivni ili dvosmisleni rezultati uoče jedino u prisutnosti jasnih znakova citotoksičnosti, zaključuje se da je istraživanje dvosmisleno u pogledu genotoksičnosti, osim ako postoji dovoljno informacija koje omogućuju donošenje konačnog zaključka. Ako je negativan rezultat istraživanja popraćen znakovima toksičnosti pri svim ispitanim dozama, može biti preporučljivo provesti dodatno istraživanje s netoksičnim dozama.

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe, ili datum za ponovnu analizu ako je poznat.

Jednokomponentna tvar:

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Višekomponentna tvar, UVCB tvar i smjesa:

— opisane koliko god je to moguće kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka.

Otapalo/nosač:

— obrazloženje za odabir otapala/nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,

— priprema formulacija za doziranje,

— analitička određivanja formulacija (tj. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije).

Pokusne životinje:

— upotrijebljena vrsta/subpopulacija te znanstveno i etičko obrazloženje njihova odabira,

— broj, starost i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana, obogaćivanje okoliša itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku i na kraju ispitivanja, uključujući raspon tjelesnih masa, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti:

— podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),

▼M7

— podaci iz studije za utvrđivanje raspona (ako je provedena),

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— obrazloženje odabira puta primjene,

— mjesto ubrizgavanja (za studije s potkožnom ili intravenoznom primjenom),

— metode pripremanja uzoraka, ovisno o slučaju, histopatološke analize, posebno za kemikalije koje su dale pozitivan rezultat u komet-testu,

— obrazloženje odabira tkiva,

— metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok,

— ako se dobiju negativni rezultati,

— stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani / vodi za piće (ppm) i potrošnje, ako je primjenjivo,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— detaljan opis rasporeda tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje odabira (npr. toksikokinetički podaci, ako su dostupni),

— metoda ublažavanja bolova, analgezija,

— metoda eutanazije,

— postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,

— metode pripremanja suspenzije pojedinačnih stanica/jezgri,

— izvor i brojevi serija svih reagensa (ako je moguće),

— metode procjene citotoksičnosti,

— uvjeti elektroforeze,

— primijenjene tehnike bojenja i metode pregledavanja i mjerenja kometa.

Rezultati:

— opća klinička zapažanja, ako postoje, prije i tijekom razdoblja ispitivanja za svaku životinju,

— dokazi o citotoksičnosti, ako je provedena analiza,

▼M7

— za istraživanja dulja od tjedan dana: pojedinačna tjelesna masa životinja tijekom istraživanja, uključujući raspon tjelesnih masa, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu; potrošnja hrane,

— odnos između doze i odgovora, ako je vidljiv,

— za svako tkivo/životinju, postotak DNK u repu (ili drugi parametar, ako je izabran) te vrijednosti medijana po predmetnom stakalcu, srednje vrijednosti po životinji i srednje vrijednosti po skupini,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama i podaci o negativnim kontrolama iz prijašnjih ispitivanja s rasponima, srednjim vrijednostima/medijanima i standardnim odstupanjima za svako pregledano tkivo,

— podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama i podaci o pozitivnim kontrolama iz prijašnjih ispitivanja,

— za druga tkiva osim jetre, krivulja doza – odgovor koja odgovara pozitivnoj kontroli. Krivulja se može utvrditi na temelju podataka prikupljenih tijekom dokazivanja tehničke osposobljenosti (vidjeti stavke 16. do 17.) i trebala bi biti popraćena obrazloženjem, s upućivanjima na aktualnu literaturu, koje pokazuje da opseg i disperzija odgovora odgovaraju kontrolama u predmetnom tkivu,

— primijenjene statističke analize i metode te kriteriji prema kojima se odgovor smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,

— učestalost fantomskih stanica u svakoj skupini i po životinji.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

Literatura

LITERATURA

1. Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, str. 114–32.

2. Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, str. 245–54.

3. Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, str. 31–5.

4. Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, str. 143.–63.

5. Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, str. 233.–40.

6. Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, str. 45.–51.

7. McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, str. 47.–63.

8. Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, str. 206.–21.

▼M7

9. Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, str. 184.–91.

10. Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, str. 40.–69.

11. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

12. OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

13. Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, str. 86.–94.

14. Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, str. 207.–14.

15. Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, str. 249.–61.

16. Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, str. 108.–20.

17. Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, str. 145.–54.

18. Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, str. 187.–99.

19. Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, str. 7.–19.

20. Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, str. 149.–62.

21. O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, str. 621.–3.

22. Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, str. 51.–9.

23. Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, str. 28.–41.

24. Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,Vol. 393/1-2, str. 175.–8.

▼M7

25. Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, str. 175.–80.

26. Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, str. 240.–9.

27. Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, str. 26.–30.

28. Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, str. 51.–9.

29. Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, str. 31.–5.

30. Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, str. 486.–500.

31. Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, str. 629.–799.

32. Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, str. 53.–74.

33. Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, str. 3.–12.

34. Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, str. 275.–282.

35. Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, str. 443.–451.

36. Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, str. 167.–72.

37. Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, str. 196.–201.

38. Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, str. 165.–81.

39. Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, str. 267.–282.

▼M7

40. Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), str. 7.–16.

41. Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, str. 31.–5.

42. Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, str. 53.–64.

43. Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, str. 689.–95.

44. Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, str. 109.–11.

45. Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, str. 113.–23.

46. Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, str. 41.–45.

47. Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, str. 87.–90.

48. Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

49. Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

50. Poglavlje B.8. ovog Priloga: *Subakutna inhalacijska toksičnost: 28-dnevna studija*.

51. Poglavlje B.29. ovog Priloga: *Subkronična inhalacijska toksičnost: 90-dnevna studija*.

52. Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, str. 141.–45.

53. Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, str. 35.–41.

54. OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

55. Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, str. 50.–4.

56. Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, str. 45.–51.

57. Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

58. Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, str. 109.–19.

▼**M7**

59. Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, str. 167.–75.

60. Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, str. 485.–93.

61. Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, str. 171.–82.

▼**M7**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Elektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu u alkalnim uvjetima: osjetljiva tehnika za otkrivanje primarnih oštećenja DNK na razini pojedinačnih stanica/jezgri.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Komet: oblik koji poprimaju nukleoidi pod utjecajem jednog od elektroforetskih polja, nazvan tako zbog sličnosti s kometima: glava je jezgra, a rep čini DNK koji migrira od jezgre u električnom polju.

Kritična varijabla/parametar: to je varijabla protokola čija mala promjena može u velikoj mjeri utjecati na zaključak testa. Kritične varijable mogu biti specifične za određeno tkivo. Kritične varijable ne bi trebalo izmijeniti, posebno ne tijekom ispitivanja, a da se ne razmotri kako će ta izmjena utjecati na testnu reakciju, što može biti vidljivo, na primjer, po opsegu i varijabilnosti reakcije u pozitivnim i negativnim kontrolama. U izvješću o ispitivanju trebalo bi navesti izmjene kritičnih varijabli izvršenih tijekom ispitivanja ili u usporedbi sa standardnim protokolom laboratorija te obrazložiti svaku izmjenu.

Intenzitet repa ili postotak DNK u repu: odgovara intenzitetu repa kometa u odnosu na ukupan intenzitet (glava plus rep). Odražava količinu lomova DNK izraženu u obliku postotka.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

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

▼M7

Dodatak 2.

FAKTORSKI MODEL ZA UTVRĐIVANJE RAZLIKA MEĐU SPOLOVIMA U *IN VIVO* KOMET-TESTU

Faktorski model i njegova analiza

Prema ovom modelu svakoj se koncentraciji izlaže najmanje pet mužjaka i pet ženki, što znači da se upotrebljava najmanje 40 životinja (20 mužjaka i 20 ženki, plus odgovarajuće pozitivne kontrole).

Model, koji je jedan od jednostavnijih faktorskih modela, istovjetan je dvosmjernoj analizi varijance (ANOVA) sa spolom i razinom koncentracije kao glavnim učincima. Podaci se mogu analizirati primjenom mnogih standardnih statističkih softverskih paketa kao što su SPSS, SAS, STATA i Genstat, kao i primjenom softvera R.

Varijabilnost u skupu podataka analizom se dijeli na varijabilnost među spolovima, varijabilnost među koncentracijama i varijabilnost povezanu s interakcijom između spolova i koncentracija. Svaka od vrijednosti ispituje se u odnosu na procijenjenu varijabilnost među životinjama iz skupina životinja istog spola kojima je dana jednaka koncentracija. Potpuni podaci o osnovnoj metodologiji dostupni su u brojnim standardnim statističkim priručnicima (vidjeti literaturu) i sadržajima za pomoć osiguranima u okviru statističkih paketa.

U analizi se nakon toga ispituje vrijednost interakcije spol x koncentracija u tablici ANOVA ([1]). U slučaju izostanka značajne vrijednosti interakcije kombiniranim vrijednostima za spolove ili razine koncentracije osiguravaju se valjana statistička ispitivanja među razinama na temelju vrijednosti varijabilnosti analize varijance objedinjene unutar skupine.

Analiza se nastavlja razdjeljivanjem procijenjene varijabilnosti među koncentracijama na kontraste kojima se osigurava ispitivanje linearnih i kvadratnih kontrasta odgovora unutar razina koncentracije. Ako je prisutna značajna interakcija spol x koncentracija, ta se vrijednost jednako tako može razdijeliti na linearne kontraste interakcije x spol i kvadratne kontraste interakcije x spol. Na temelju tih vrijednosti provode se ispitivanja kojima se utvrđuje jesu li odgovori na koncentraciju paralelni za oba spola odnosno postoji li razlika u odgovoru između dvaju spolova.

Procijenjena varijabilnost, koja je objedinjena unutar skupine, može se upotrijebiti za provedbu testova parova za utvrđivanje razlike između srednjih izmjerenih vrijednosti. Usporedbe se mogu napraviti između srednjih izmjerenih vrijednosti za oba spola i među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite razine koncentracije, na primjer za usporedbe s razinama negativnih kontrola. U slučajevima značajne interakcije može se napraviti usporedba među srednjim izmjerenim vrijednostima za različite koncentracije unutar spola ili između srednjih izmjerenih vrijednosti za spolove pri jednakoj koncentraciji.

Literatura

Mnogo je statističkih priručnika u kojima se raspravlja o teoriji, planiranju, metodologiji, analizi i tumačenju faktorskih modela, od najjednostavnijih analiza s dva čimbenika do složenijih oblika koji se primjenjuju u metodologiji planiranja pokusa. U nastavku se nalazi nepotpuni popis. U nekim priručnicima navedeni su razrađeni primjeri usporedivih modela, u određenim slučajevima s kodom za provedbu analiza uz primjenu različitih softverskih paketa.

([1]) Statističari koji primjenjuju model poput općih linearnih modela (GLM – *General Linear Models*) mogu provoditi analizu na drukčiji, ali usporediv način, no rezultat neće nužno biti tradicionalna tablica ANOVA koja datira iz vremena algoritamskih pristupa statističkim izračunima razvijenih u predinformatičko doba.

▼**M7**

1. Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

2. Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

3. Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

4. Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

5. Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

6. Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

7. Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Dodatak 3.

TRENUTAČNA OGRANIČENJA TESTA

S obzirom na trenutačne spoznaje nekoliko je ograničenja povezano s *in vivo* komet-testom. Očekuje se da će se ta ograničenja smanjiti ili preciznije definirati u mjeri u kojoj će iskustvo stečeno u primjeni testa omogućiti odgovore na pitanja sigurnosti u regulatornom kontekstu.

1. Neka oštećenja DNK mogu kratko trajati, tj. mogu se tako brzo popraviti da ih nije moguće uočiti 24 ili više sati nakon zadnje doze. Ne postoji potvrđen popis kratkotrajnih oštećenja ni kemikalija koje vjerojatno uzrokuju takve vrste oštećenja niti je poznato u kojem se vremenskom razdoblju ta oštećenja mogu otkriti. Optimalno vrijeme uzorkovanja može isto tako biti specifično za pojedinu kemikaliju ili put primjene te bi stoga vremena uzorkovanja trebalo odrediti na temelju kinetičkih podataka (npr. vrijeme T_{max} pri kojemu se postiže vršna koncentracija u plazmi ili tkivu), ako su takvi podaci dostupni. U većini validacijskih studija na kojima se temelji ova ispitna metoda navodi se provedba obdukcije dva ili tri sata nakon primjene posljednje doze. U većini objavljenih studija opisuje se davanje posljednje doze između dva i šest sati prije usmrćivanja životinje. Stoga su u ovoj ispitnoj metodi ta iskustva poslužila kao osnova za preporuku da bi posljednju dozu trebalo dati u određenom trenutku dva do šest sati prije obdukcije ako ne postoje podaci na temelju kojih bi trebalo postupiti drukčije.

2. Ne postoje potvrđeni podaci iz studija koji govore o osjetljivosti testa za otkrivanje kratkotrajnih oštećenja DNK nakon primjene putem hrane ili vode za piće u usporedbi s primjenom sondom. Oštećenja DNK otkrivena su nakon primjene tvari putem hrane i vode za piće, ali izvješća o ispitivanjima u kojima je upotrijebljen taj put primjene relativno su malobrojna u usporedbi s mnogo većim iskustvom u primjeni sondom i intraperitonealno. Stoga osjetljivost testa može biti smanjena u slučaju kemikalija koje izazivaju kratkotrajna oštećenja ako se primijene putem hrane ili vode za piće.

3. S obzirom na to da nisu provedena međulaboratorijska istraživanja na drugim tkivima osim na jetri i želucu, nije utvrđena preporuka o tome kako postići osjetljiv i obnovljiv odgovor u drugim tkivima osim jetre, poput očekivanih raspona za pozitivne i negativne kontrole. Kad je riječ o jetri, isto se tako nije mogao postići dogovor o snižavanju granične vrijednosti za negativnu kontrolu.

4. Iako postoji više publikacija u kojima se pokazuje zbunjujući učinak citotoksičnosti *in vitro*, objavljeno je vrlo malo podataka *in vivo* te stoga nije moguće preporučiti neku jedinstvenu mjeru citotoksičnosti. Histopatološke promjene poput upale, infiltracije stanica, apoptotskih ili nekrotskih promjena povezane su s povećanom migracijom DNK, ali kako je pokazalo validacijsko ispitivanje što ga je proveo JaCVAM (OECD, 2014.), te promjene nisu uvijek popraćene pozitivnim rezultatima u komet-testu te stoga ne postoji konačan popis histopatoloških promjena koje su uvijek povezane s povećanom migracijom DNK. Fantomske stanice (*hedgehogs, clouds, ghost cells*) prethodno su bile predložene kao indikator citotoksičnosti, ali njihova se etiologija ne može sa sigurnošću utvrditi. Prema nekim podacima one mogu nastati zbog citotoksičnosti povezane s kemikalijom, mehaničkog / enzimski induciranog oštećenja započetog tijekom pripreme uzoraka (Guerard *et al*., 2014.) i/ili ekstremnijeg učinka genotoksičnosti ispitivane kemikalije. Prema drugim podacima čini se da su posljedica opsežnog, ali možda popravljivog oštećenja DNK (Lorenzo *et al*., 2013.).

▼M7

5. Tkiva ili stanične jezgre mogu se uspješno zamrznuti za kasnije analize. To obično dovodi do mjerljivog učinka na odgovor na nosač i pozitivnu kontrolu (Recio *et al.,* 2010.; Recio *at al.*, 2012.; Jackson *at al.*, 2013.). Ako laboratorij primjenjuje metode zamrzavanja, trebao bi dokazati osposobljenost za njihovo izvođenje i potvrditi prihvatljive niske raspone postotaka DNK u repu kometa u ciljnim tkivima životinja tretiranih nosačem, te da se i dalje mogu otkriti pozitivni odgovori. U literaturi su opisane različite metode zamrzavanja tkiva. Međutim, trenutačno ne postoji suglasnost o tome kako je najbolje zamrznuti i odmrznuti tkiva te kako procijeniti može li potencijalno izmijenjen odgovor utjecati na osjetljivost testa.

6. Najnoviji radovi pokazuju da se može očekivati da će popis kritičnih varijabli postajati sve kraći te da će parametri za kritične varijable biti preciznije definirani (Guerard *et al*., 2014.).

Literatura

1. Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, str. 114.–21.

2. Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, str. 699.–707.

3. Lorenzo, Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, str. 427.–32.

4. OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

5. Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

6. Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, str. 101.–13.

▼M8

B.63. TEST PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 421 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 421 donesena je 1995. na temelju protokola za preliminarni test probira za reproduktivnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).

2. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim učincima endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (3.). Na primjer, Smjernica OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza, poglavlje B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 421 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje učinke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir ako razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).

3. Odabrani dodatni relevantni krajnji učinci endokrinih ometača, koji su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, poglavlje B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 421 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanima s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (4.).

4. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

5. Ova se ispitna metoda za probir može upotrebljavati za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na reprodukciju i/ili razvoj, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava kemikalija ili za zabrinjavajuće kemikalije. Može se upotrebljavati i kao dio testova početnog probira za postojeće kemikalije za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija, kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnije reproduktivne/razvojne studije ili ako se smatra relevantnom iz drugih razloga. Pri provođenju istraživanja treba slijediti opća načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (5.).

▼M8

6. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) relativno malog broja životinja u skupinama koje primaju dozu, selektivnosti krajnjih učinaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.

7. Rezultate dobivene parametrima povezanima s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (6.). U tom Konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 421 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.

8. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.

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

10. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna te do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti podroban histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna, nakon čega slijedi podrobna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnima da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

12. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.

13. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].

▼M8

14. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje uginu ili su usmrćene tijekom razdoblja ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

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

Smještaj i hranjenje

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

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

18. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

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

Priprema doza

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

▼M8

21. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Preporučuje se da se, kad je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače koji nisu voda moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane kemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

22. Preporučuje se da se u svakoj skupini započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa i životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće se uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po skupini. Osim u slučaju znatnih toksičnih učinaka, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po skupini, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po skupini. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane kemikalije da utječe na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F_1 od začeća do 13. dana nakon okota.

Doziranje

23. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Visine doze mogu se temeljiti na informacijama iz ispitivanja akutne toksičnosti ili na rezultatima istraživanja s ponovljenim dozama. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.

24. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili velike patnje životinja. Nakon toga treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da se kod najniže doze ne opažaju štetni učinci (NOAEL). Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu ispitnu skupinu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 10).

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

Granični test

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

▼M8

Primjena doza

27. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba životinjama dati u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

28. Kod ispitivane kemikalije koja se primjenjuju s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje.

Plan pokusa

29. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti najmanje dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Dan okota (tj. kad se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.

30. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).

31. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Postupak parenja

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

▼M8

Veličina legla

33. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva dodatna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

34. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Opažanja uživo

Klinička opažanja

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

Tjelesna masa i unos hrane/vode

36. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.

37. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje s vodom za piće.

Ciklusi estrusa

38. Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za studiju izabrale ženke s uobičajenim ciklusom (vidjeti stavak 22.). Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisovi od početka razdoblja tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu učinaka akutnog stresa

▼M8

koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratoriji mogu izlagati ispitne životinje dva tjedna, zatim svaki dan prikupiti vaginalne brisove kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dva tjedna tijekom razdoblja prije parenja, uz stalno praćenje tijekom razdoblja parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza jer to može inducirati lažnu trudnoću (7. i 8.).

Parametri potomaka

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

40. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja opisana u stavku 35. trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.

41. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase (9.)). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151 (10.).

Klinička biokemija

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

— od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 33.–34.),

— od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i

— od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

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

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

— vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,

— metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,

— pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.

▼M8

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

Patologija

Makroskopska nekropsija

45. U trenutku usmrćivanja ili u slučaju smrti tijekom istraživanja, odrasle životinje treba makroskopski pregledati radi otkrivanja bilo kakvih abnormalnosti ili patoloških promjena. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati ujutro na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom jajnika.

46. Sjemenike i sjemene kanaliće (epididimis) te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja.

47. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrti 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti. Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja. Na 13. bi se dan trebala sačuvati štitnjača jednog muškog i jednog ženskog mladunca po leglu.

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

Histopatologija

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

▼M8

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

50. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnog/razvojnog učinka naveden je u Dodatku 3.

51. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za reproduktivne krajnje točke. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje i treba je odabrati prije početka istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog toga što su skupine male, kao pomoć u tumačenju istraživanja mogu biti korisni podaci iz prijašnjih kontrola (npr. za veličinu legla) ako su dostupni.

Ocjena rezultata

52. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.

53. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u vezi s reprodukcijom/razvojem (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4) ako su dostupni.

54. Radi kontrole kvalitete predlaže se da se prikupljaju podaci o prijašnjim kontrolama te da se izračunaju koeficijenti varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvješće o ispitivanju

55. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

▼**M8**

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

— korištena vrsta/soj,

— broj, dob i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,

— obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— podroban opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene tjelesne mase,

— unos hrane i unos vode, ako su dostupni,

— podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove toksičnosti,

— duljina gestacije,

— toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,

— vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),

— broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,

— broj živorođenih i gubitaka nakon implantacija,

— podaci o tjelesnoj masi mladunaca,

— anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),

▼M8

— zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,

— razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (i u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),

— broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,

— vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,

— broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,

— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis histopatoloških nalaza,

— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

Tumačenje rezultata

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

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. – 11. ožujka 1998. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

4. OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

5. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

6. OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84.–97.

8. Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

9. Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383.–390.

10. OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

11. OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

12. OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

Dodatak 1.

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

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

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

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

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. $T_{3)}$ u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

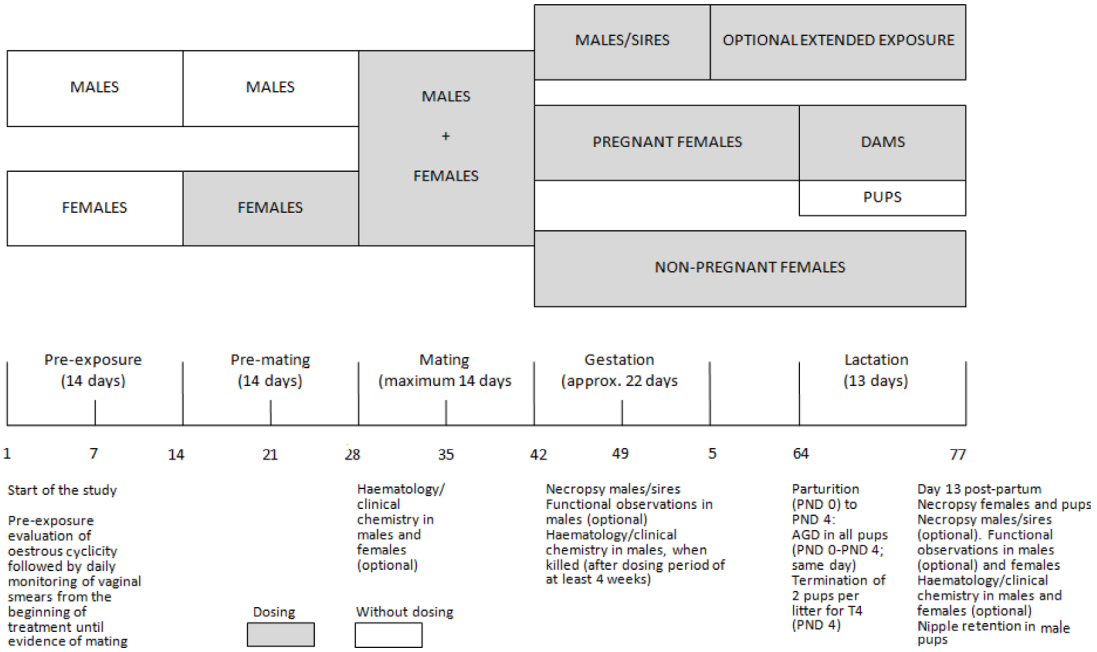
Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. $T_{3)}$ u organizmu sisavaca.

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

▼**M8**

Dodatak 2.

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



▼**M8**

Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

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

▼**M8**

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
Doziranje (jedinice)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno/nakon implantacije (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					
Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

([1]) posljednji dan razdoblja parenja

▼M8

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 422 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 422 donesena je 1996. na temelju protokola za kombinirani test s ponovljenim dozama i testa probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).

2. U ovoj se ispitnoj metodi kombinira dio koji se odnosi na probir za reproduktivnu/razvojnu toksičnost, koji se temelji na iskustvu koje su zemlje članice stekle upotrebom izvorne metode o postojećim kemikalijama koje se proizvode u velikim količinama i na temelju istraživačkih ispitivanja s tvarima za pozitivnu kontrolu (3. i 4.), te dio koji se odnosi na toksičnost s ponovljenim dozama, u skladu sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza; odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga).

3. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim točkama endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (5.). U tom kontekstu Smjernica za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 422 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje točke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir kod kojih razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).

4. Odabrane dodatne relevantne krajnje točke endokrinih ometača, koje su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, koja odgovara poglavlju B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 422 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanima s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (6.).

5. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki, kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Pri procjeni i ocjenjivanju toksičnih svojstava ispitivane kemikalije određivanje oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza može se provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz ispitivanja akutne toksičnosti. To istraživanje pruža informacije o mogućnim opasnostima po zdravlje do kojih bi moglo doći zbog ponovljenog izlaganja tijekom relativno ograničenog vremenskog razdoblja. Ta metoda obuhvaća osnovno istraživanje toksičnosti s ponovljenim dozama koje se može upotrijebiti za kemikalije za koje nije opravdano 90-dnevno istraživanje (npr. ako proizvedena količina ne prelazi određene granice) ili kao preliminarno istraživanje za dugotrajno istraživanje. Pri provođenju istraživanja treba slijediti osnovna načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (7.).

▼M8

7. Nadalje, obuhvaća test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i stoga se može upotrebljavati i za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava ispitivanih kemikalija ili za zabrinjavajuće ispitivane kemikalije. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) selektivnosti krajnjih točaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju reproduktivnih/razvojnih učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.

8. Rezultate dobivene parametrima povezanima s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (8.). U tom konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 422 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.

9. Ova ispitna metoda naglasak stavlja i na neurološke učinke kao specifičnu krajnju točku, a naglašava i potrebu za pozornim kliničkim opažanjem životinja kako bi se dobilo što više informacija. Cilj je ove metode identificirati kemikalije koje imaju neurotoksički potencijal, što može zahtijevati daljnja podrobna istraživanja tog aspekta. Osim toga, metoda može pokazati i osnovne imunološke učinke.

10. Ako ne postoje podaci iz drugih istraživanja sustavne toksičnosti, reproduktivne/razvojne toksičnosti, neurotoksičnosti i/ili imunotoksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira. Ispitivanje može biti osobito korisno kao dio OECD-ova podatkovnog skupa za informacije o probiru (SIDS) za procjenu postojećih kemikalija za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija i može služiti kao alternativa provođenju dvaju zasebnih ispitivanja toksičnosti s ponovljenim dozama (Smjernica OECD-a za ispitivanje 407, koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) odnosno reproduktivne/razvojne toksičnosti (Smjernica OECD-a za ispitivanje 421, koja odgovara poglavlju B.63. ovog Priloga). Može se upotrebljavati i kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnija reproduktivna/razvojna istraživanja ili ako se smatra relevantnim iz drugih razloga.

11. Općenito se pretpostavlja da postoje razlike u osjetljivosti između gravidnih životinja i onih koje nisu gravidne. Stoga u ovom kombiniranom testu može biti teže odrediti visine doza koje su primjerene i za procjenu opće sustavne toksičnosti i specifične reproduktivne/razvojne toksičnosti nego kod zasebnog provođenja pojedinačnih ispitivanja. Nadalje, tumačenje rezultata ispitivanja u pogledu opće sustavne toksičnosti može biti teže nego kod provođenja zasebnog istraživanja s ponovljenim dozama, osobito ako se serumski i histopatološki parametri ne procjenjuju u isto vrijeme tijekom istraživanja. Zbog te tehničke složenosti za provođenje ovog kombiniranog testa probira potrebno je znatno iskustvo u području ispitivanja

▼M8

toksičnosti. S druge strane, osim manjeg broja životinja koje sudjeluju, kombinirani test može pružiti bolji način za razlikovanje izravnih učinaka na reprodukciju/razvoj od učinaka koji su sekundarni u odnosu na druge (sustavne) učinke.

12. U ovom je ispitivanju razdoblje doziranja dulje nego kod uobičajenog 28-dnevnog istraživanja s ponovljenim dozama. Međutim, upotrebljava se manje životinja svakog spola po skupini u usporedbi sa situacijom u kojoj se uz test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost provodi uobičajeno 28-dnevno istraživanje s ponovljenim dozama.

13. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.

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

15. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

16. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti podroban histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna, nakon čega slijedi podrobna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnima da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

17. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.

18. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].

19. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

▼M8

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

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

Smještaj i hranjenje

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

22. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tijekom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.

23. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

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

Priprema doza

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

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

▼M8

POSTUPAK

Broj i spol životinja

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

Doziranje

28. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Ako nisu dostupni prikladni podaci o općoj toksičnosti, može se provesti istraživanje o utvrđivanju raspona (životinje istog soja i podrijetla) kako bi se pomoglo pri određivanju visina doze koje će se primjenjivati. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.

29. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili očite patnje. Nakon toga, treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da kod najniže doze nema štetnih učinaka. Često je optimalno doze primijeniti u dvostrukim do četverostrukim intervalima te je često bolje dodati i četvrtu ispitnu skupinu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10).

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

Granični test

31. Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan ili, kod davanja doze s hranom, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće (na temelju određivanja tjelesne mase), u skladu s postupcima opisanima za ovo istraživanje, ne proizvede uočljive toksične učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih tvari ne treba očekivati toksičnost,

▼M8

može se smatrati da provođenje potpunog istraživanja s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalno izlaganje koje se može postići često je određeno fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih kemikalija.

Primjena doza

32. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba dati životinjama u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

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

Plan pokusa

34. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Kako bi se omogućio post ženki (majki) preko noći prije uzimanja krvi (ako se prednost daje toj opciji), ženke i njihovi potomci ne moraju se nužno usmrtiti istog dana. Dan okota (tj. kada se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.

35. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).

▼M8

36. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje, ako su uključene, ne pare se. One se trebaju držati još najmanje 14 dana nakon prvog planiranog usmrćivanja ženki (majki), bez tretiranja, kako bi se otkrili zakašnjeli toksični učinci, postojanost toksičnih učinaka ili oporavak od toksičnih učinaka.

37. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Ciklusi estrusa

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

Postupak parenja

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

Veličina legla

40. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva suvišna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

41. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica, osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

▼M8

Opažanja

42. Opća klinička opažanja treba provoditi najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Zdravstveno stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i smrtnosti.

43. Jednom prije prvog izlaganja i barem jednom tjedno nakon toga treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih roditeljskih životinja (to će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obavljati izvan kaveza u kojima se životinje drže, u standardnom ograđenom prostoru i, po mogućnosti, svaki dan u isto vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti se sustavom ocjenjivanja koji je jasno definirao laboratorij koji obavlja ispitivanje. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima ispitivanja budu minimalna te da opažanja po mogućnosti provode promatrači koji nisu upoznati s tretiranjem. Znakovi koji se bilježe trebaju, među ostalim, uključivati promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka, izlučine i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija (lučenje suza), piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na postupanje sa životinjama, kao i pojavu kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipije (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug), otežane ili produljene parturicije ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (10.).

44. U određenom trenutku tijekom istraživanja treba procijeniti osjetilnu reaktivnost na podražaje raznih vrsta (npr. auditivne, vizualne i proprioceptivne podražaje) (8., 9. i 11.), jakost stiska (12.) i motornu aktivnost (13.) u pet mužjaka i pet ženki nasumično odabranih iz svake skupine. Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, mogu se primjenjivati i drugi postupci koji nisu u njoj navedeni. Kod mužjaka bi se ta funkcionalna opažanja trebala provoditi pred kraj razdoblja doziranja, neposredno prije planiranog usmrćivanja, ali prije uzimanja uzoraka krvi za hematologiju ili kliničku kemiju (vidjeti stavke 53.–56., uključujući bilješku 1.). Ženke bi tijekom tih funkcionalnih ispitivanja trebale biti u fiziološki sličnom stanju i po mogućnosti bi ih trebalo ispitati jednom tijekom posljednjeg tjedna laktacije (npr. od 6. do 13. dana laktacije), neposredno prije planiranog usmrćivanja. Vrijeme razdvajanja ženki (majki) i mladunaca trebalo bi se smanjiti u mjeri u kojoj je to moguće.

45. Funkcionalna opažanja koja se obavljaju jednom pred kraj istraživanja mogu se izostaviti ako se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje za naknadno (90-dnevno) istraživanje subkroničnosti ili dugotrajno istraživanje. U tom slučaju funkcionalna opažanja treba uključiti u to sljedeće istraživanje. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim opažanjima iz tog istraživanja uz primjenu ponovljenih doza može biti od pomoći u odabiru visina doza u naknadnom istraživanju subkroničnosti ili dugotrajnom istraživanju.

46. U iznimnim slučajevima funkcionalna opažanja mogu izostati i kod skupina koje inače pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala uspješnost funkcionalnog ispitivanja.

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

▼M8

48. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja roditeljskih životinja (vidjeti stavke 43. i 44.) trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.

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

Tjelesna masa i unos hrane/vode

50. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.

51. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje tim putem.

Hematologija

52. Na pet mužjaka i pet ženki koji se nasumično odaberu iz svake skupine trebalo bi jednom tijekom istraživanja provesti sljedeće hematološke preglede: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, retikulociti, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi. Ostala određivanja koja treba provesti ako ispitivana kemikalija ili njezini navodni metaboliti imaju ili se sumnja da imaju oksidacijska svojstva obuhvaćaju koncentraciju methemoglobina i Heinzova tjelešca.

53. Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu. Ženke bi tijekom uzimanja uzoraka trebale biti u fiziološki sličnom stanju. Kako bi se izbjegle praktične poteškoće povezane s varijabilnosti početka gestacije, krv se kod ženki može uzimati na kraju razdoblja prije parenja kao alternativa uzimanju uzoraka neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Uzorke krvi mužjaka po mogućnosti bi trebalo uzimati neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Kao alternativa, krv se kod mužjaka može uzimati i na kraju razdoblja prije parenja ako je tom vremenu uzorkovanja dana prednost kod ženki.

54. Uzorke krvi trebalo bi pohraniti u primjerenim uvjetima.

Klinička biokemija

55. Kliničko-biokemijske pretrage za istraživanje glavnih toksičnih učinaka u tkivima i posebno učinaka na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobivenima od pet mužjaka i pet ženki odabranih iz svake skupine.

▼M8

Preporučuje se da životinje tijekom noći pred uzimanje uzoraka krvi poste ([1]). Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebale bi obuhvatiti mjerenje natrija, kalija, glukoze, ukupne količine kolesterola, ureje, kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te najmanje dva enzima koji su pokazatelji hepatocelularnih učinaka (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza i sorbitol dehidrogenaza) te žučne kiseline. Mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog podrijetla) i bilirubina mogu u određenim okolnostima pružiti korisne informacije.

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

— od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 40.–41.),

— od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i

— od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

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

57. U zadnjem tjednu istraživanja, po izboru, mogu se obaviti analize urina pet nasumično odabranih mužjaka iz svake skupine dobivenog prikupljanjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne stanice.

58. Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera koji označavaju opće oštećenja tkiva. Ostale pretrage, koje bi trebalo obaviti ako poznata svojstva ispitivane kemikalije mogu ili se sumnja da bi mogla utjecati na povezane metaboličke profile uključuju utvrđivanje razine kalcija, fosfata, triglicerida natašte, glukoze natašte, razine specifičnih hormona, methemoglobina i aktivnosti kolinesteraze. Njih treba identificirati od slučaja do slučaja.

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

— vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,

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

▼M8

— metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,

— pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.

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

61. Ako su prijašnji polazni podaci neprikladni, u obzir treba uzeti određivanje hematoloških i kliničkih biokemijskih varijabli prije početka doziranja ili po mogućnosti na skupini životinja koje nisu uključene u pokusne skupine. Kod ženki se podaci moraju dobiti od životinja koje doje.

PATOLOGIJA

Makroskopska nekropsija

62. Sve odrasle životinje korištene u istraživanju trebale bi se podvrgnuti kompletnoj, podrobnoj makroskopskoj nekropsiji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihova sadržaja. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom ženskih reproduktivnih organa.

63. Sjemenike i sjemene kanaliće te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja. Treba sačuvati jajnike, sjemenike, sjemene kanaliće, sekundarne spolne organe i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja.

64. Štitnjača svih odraslih mužjaka i ženki te jednog mužjaka i jedne ženke starih 13 dana iz svakog legla trebala bi se sačuvati u najprimjerenijem sredstvu za fiksiranje radi planiranog kasnijeg histopatološkog pregleda. Masa štitnjače može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu. Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu i pohraniti u odgovarajućim uvjetima neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja (vidjeti stavak 56.).

▼M8

65. Osim toga, kod najmanje pet odraslih mužjaka i ženki nasumično odabranih iz svake skupine (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su eutanazirani prije kraja istraživanja) s jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, timusa, slezene, mozga i srca treba obrezati sve prianjajuće tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo da se osuše. Sljedeća tkiva treba sačuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve makrolezije, mozak (reprezentativne regije uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu, oko, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, timus, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), spolne žlijezde (sjemenike i jajnike), sekundarne spolne organe (maternicu i cerviks, sjemene kanaliće, prostatu, sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama), vaginu, mokraćni mjehur, limfne čvorove (osim najbližeg drenažnog čvora treba uzeti još jedan limfni čvor na temelju laboratorijskog iskustva (16.)), periferni živac (ishijadični ili tibijalni) po mogućnosti smješten uz mišić, skeletni mišić i kost, s leđnom moždinom (sekcija ili, kao alternativna, svježe pripremljen aspirat koštane srži). Preporučuje se da se sjemenici fiksiraju uranjanjem u Bouinov ili izmijenjeni Davidsonov fiksativ (16., 17. i 18.); za ta se tkiva ne preporučuje fiksacija u formalinu. Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa. Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni.

66. Sljedeća tkiva mogu dati dragocjenu indikaciju za učinke na endokrini sustav: spolne žlijezde (jajnici i sjemenici), sekundarni spolni organi (maternica s cerviksom, sjemeni kanalići, sjemeni mjehurići s koagulacijskim žlijezdama, dorzolateralna i ventralna prostata), vagina, hipofiza, muška mliječna žlijezda i nadbubrežna žlijezda. Promjene u muškim mliječnim žlijezdama nisu dovoljno dokumentirane, ali taj parametar može biti vrlo osjetljiv na tvari s estrogenskim djelovanjem. Opažanja organa/tkiva koja nisu navedena u stavku 65. nisu obvezna.

67. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrti 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti. Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja.

Histopatologija

68. Na sačuvanim organima i tkivima odabranih životinja iz kontrolne skupine i skupina tretiranih visokim dozama treba napraviti kompletan histopatološki pregled (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze kod muških spolnih žlijezdi i histopatologiju strukture intersticijskih stanica sjemenika). Po potrebi se mogu pregledati štitnjače mladunaca i preostalih odraslih životinja. Ta ispitivanja treba proširiti na životinje drugih skupina doziranja ako su u skupini s visokom dozom uočene promjene povezane s tretiranjem. Smjernica o histopatologiji (10.) pruža dodatne podrobne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

69. Treba pregledati sve makrolezije. Kako bi se pomoglo pojasniti NOAEL-e, treba pregledati ciljne organe kod skupina tretiranih ostalim dozama, osobito u skupinama kod kojih se tvrdi da pokazuju NOAEL.

▼M8

70. Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled tkiva i organa kod kojih su u tretiranim skupinama uočeni učinci.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

71. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su eutanazirane iz humanih razloga, vrijeme smrti ili eutanazije, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnih/razvojnih učinaka naveden je u Dodatku 3.

72. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti odgovarajućom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Za usporedbe učinaka unutar raspona visina doza trebala bi se izbjeći uporaba višestrukih t-testova. Statističke metode treba odabrati u fazi planiranja istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za reproduktivne krajnje točke. Nisu primjerene neke od često korištenih metoda, osobito parametrijska ispitivanja za mjerenje središnje tendencije. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje te je treba odabrati prije početka istraživanja.

Ocjena rezultata

73. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.

74. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti i histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u pogledu reprodukcije/razvoja (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4), ako su dostupni.

75. Radi kontrole kvalitete predlaže se prikupljanje podataka o prijašnjim kontrolama te izračunavanje koeficijenata varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

▼M8

Izvješće o ispitivanju

76. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

— korištena vrsta/soj,

— broj, dob i spol životinja,

— podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,

— obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

— obrazloženje odabira visine doze,

— pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,

— pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,

— preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,

— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,

— podroban opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene tjelesne mase,

— unos hrane i unos vode, po potrebi,

▼**M8**

— podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove

— toksičnosti,

— duljina gestacije, toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,

— vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),

— ocjena osjetilne aktivnosti, jakosti stiska i motorne aktivnosti,

— hematološka ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,

— klinička biokemijska ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,

— broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,

— broj živorođenih i gubitaka nakon implantacije,

— broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,

— vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,

— broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,

— podaci o tjelesnoj masi mladunaca,

— anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),

— zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,

— razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (te u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),

— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,

— nalazi nekropsije,

— iscrpan opis histopatoloških nalaza,

— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),

— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

▼M8

Tumačenje rezultata

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

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141.–149.

4. Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89.–95.

5. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. ožujka 1998., Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

6. OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

8. Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84.–97.

9. Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

10. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

11. Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267.–283.

12. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233.–236.

13. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599.–609.

14. Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383.–390.

15. OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

16. OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

17. Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. U: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, str. 52.–85.

18. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol*. *Pathol*. 30, 524.–533.

19. OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

20. OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

Dodatak 1.

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

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

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

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

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T_3) u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

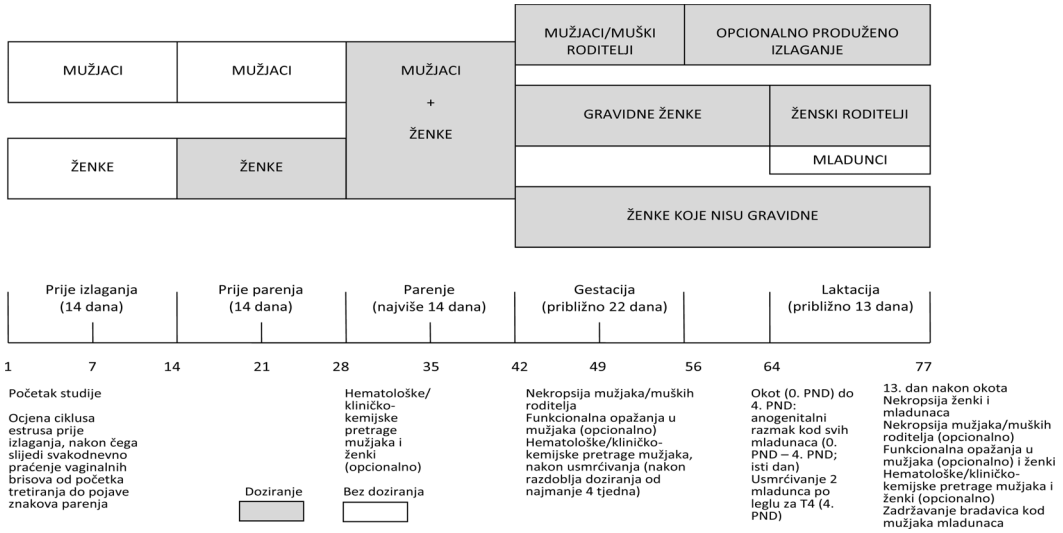
Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. T_3) u organizmu sisavaca.

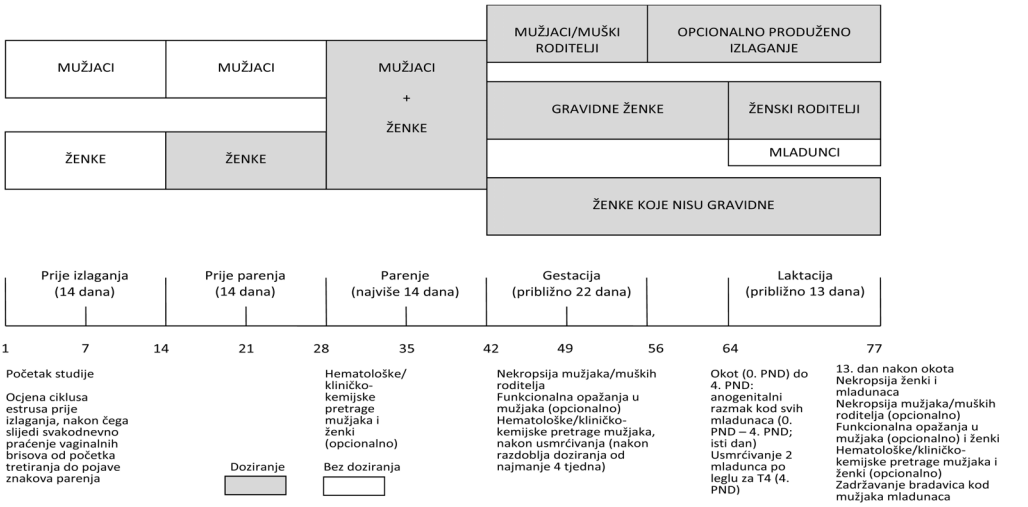
Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te pokazivanja njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

▼**M8**

Dodatak 2.

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





▼**M8**

Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

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

▼**M8**

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

([1]) Posljednji dan razdoblja parenja

▼M8

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

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 435 (TG) (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]) Europske unije. Ova ispitna metoda, ekvivalentna ažuriranoj Smjernici OECD-a za ispitivanje 435, pruža *in vitro* ispitnu metodu za nagrizanje kože s membranskom barijerom koja se može upotrebljavati za identifikaciju nagrizajućih kemikalija. U ispitnoj metodi upotrebljava se umjetna membrana koja je osmišljena tako da reagira na nagrizajuće kemikalije na sličan način kao i životinjska koža *in situ*.

2. Nagrizajuće djelovanje na kožu tradicionalno se procjenjivalo primjenom ispitivane kemikalije na kožu živih životinja i procjenom razmjera oštećenja tkiva nakon određenog vremenskog razdoblja (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu donesen je niz drugih *in vitro* ispitnih metoda (3. i 4.) kao alternativa standardnom *in vivo* postupku na koži kunića (poglavlje B.4. ovog Priloga; ekvivalentan Smjernici OECD-a za ispitivanje 404) koji se upotrebljava za identifikaciju nagrizajućih kemikalija (2.). U stupnjevanoj strategiji ispitivanja i ocjenjivanja UN GHS-a za procjenu i razvrstavanje nagrizanja kože te u Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrizanje kože preporučuje se upotreba validiranih i prihvaćenih *in vitro* ispitnih metoda u okviru modula 3. i 4. (1. i 5.). U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te i. pružaju se smjernice o tome kako integrirati i upotrijebiti postojeće podatke o ispitivanju i podatke koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaže se pristup kad je potrebno daljnje ispitivanje, među ostalim i ako se dobiju negativni rezultati (5.). U tom modularnom pristupu pozitivni rezultati iz *in vitro* ispitnih metoda mogu se upotrebljavati za razvrstavanje kemikalije kao nagrizajuće bez potrebe za ispitivanjem na životinjama, čime se smanjuje i poboljšava upotreba životinja te se izbjegavaju bol i patnja do kojih može doći kada bi se u tu svrhu upotrebljavale životinje.

3. Dovršene su validacijske studije za *in vitro* model membranske barijere koji je komercijalno dostupan pod nazivom Corrositex® (6., 7. i 8.) i koji pokazuje ukupnu točnost predviđanja nagrizanja kože od 79 % (128/163), osjetljivost od 85 % (76/89) i specifičnost od 70 % (52/74) za bazu podataka od 163 tvari i smjesa (7.). Na temelju njezine potvrđene valjanosti, ova je validirana referentna metoda (VRM) preporučena za upotrebu kao dio stupnjevane strategije ispitivanja za procjenu potencijalne opasnosti kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože (5. i 7.). Prije nego što se *in vitro* model membranske barijere za nagrizanje kože može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njegovu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njegovu predloženu uporabu kako bi se osigurala njegova sličnost s validiranom referentnom metodom (9.), u skladu s unaprijed utvrđenim zahtjevima izvedbe (10.). OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka

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

▼M8

jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u ekvivalentnu smjernicu OECD-a za ispitivanje. Smjernica OECD-a za ispitivanje 435 trenutačno obuhvaća samo jednu *in vitro* metodu i ovu ispitnu metodu – komercijalno dostupan model Corrositex®.

4. Ostale ispitne metode za ispitivanje nagrizanja kože temelje se na upotrebi rekonstituirane ljudske kože (Smjernica OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i izolirane kože štakora (Smjernica OECD-a za ispitivanje 430) (4.). Ova smjernica za ispitivanje omogućuje i daljnje razvrstavanje nagrizajućih kemikalija u tri potkategorije nagrizanja prema UN GHS-u i tri ambalažne skupine UN-a za prijevoz u pogledu opasnosti od nagrizanja. Ova Smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2006. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i i kako bi se ažurirao popis tvari za za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

DEFINICIJE

5. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

6. Ispitivanje opisano u ovoj ispitnoj metodi omogućuje identifikaciju nagrizajućih ispitivanih kemikalija i daljnje razvrstavanje nagrizajućih ispitivanih kemikalija u skladu s UN GHS-om/CLP-om (tablica 1.). Osim toga, ta se ispitna metoda može upotrebljavati kako bi se donijele odluke o nagrizajućem i nenagrizajućem svojstvu određenih razreda kemikalija, npr. organskih i anorganskih kiselina, derivata kiselina ([1]) i baza u svrhu ispitivanja određenih vrsta prijevoza (7., 11. i 12.). Ova ispitna metoda opisuje opći postupak koji je sličan validiranoj referentnoj ispitnoj metodi (7.). Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) posebno bavi učinkom nadraženosti kože na zdravlje *in vitro* (13.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (5.).

Tablica 1.

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

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

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

7. Ograničenje validirane referentne metode (7.) je to što mnoge kemikalije koje ne djeluju nagrizajuće i neke kemikalije koje djeluju nagrizajuće možda neće ispuniti uvjete za ispitivanje na temelju rezultata početnog ispitivanja

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

▼M8

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

NAČELO ISPITIVANJA

8. Ispitni sustav sastoji se od dvije sastavnice: sintetičke makromolekularne biološke barijere i detekcijskog sustava za kemikalije; u ovoj se ispitnoj metodi detekcijskim sustavom za kemikalije otkriva oštećenje membranske barijere koje uzrokuju nagrizajuće ispitivane kemikalije nakon primjene ispitivane kemikalije na površinu sintetičke makromolekularne membranske barijere (7.), uz pretpostavku da se to odvija istim mehanizmima nagrizanja koji djeluju i na živu kožu.

9. Prodiranje kroz membransku barijeru može se mjeriti različitim postupcima ili detekcijskim sustavima za kemikalije, uključujući promjenu boje pH-indikatorske boje ili nekog drugog svojstva otopine indikatora ispod barijere.

10. Trebalo bi se utvrditi da je membranska barijera valjana, tj. relevantna i pouzdana za predviđenu upotrebu. To uključuje i osiguravanje dosljednosti različitih pripravaka u pogledu svojstava barijere, npr. sposobnost očuvanja barijere u dodiru s nenagrizajućim kemikalijama, sposobnost razvrstavanja nagrizajućih svojstava kemikalija prema različitim potkategorijama nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u (1.). Odluka o razvrstavanju temelji se na vremenu koje je kemikaliji potrebno da prodre kroz membransku barijeru do otopine indikatora.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

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

Tablica 2.

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti (1)

Tvar (2)	CAS br.	Kemijski razred	*In vivo*UN GHS-u potkategorija prema (3)	*In vitro* potkategorija prema UN GHS-u (3)
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganske kiseline	1.A	1.A
Dušična kiselina	7697-37-2	Anorganske kiseline	1.A	1.A
Fosforov pentaklorid	10026-13-8	Prekursori anorganskih kiselina	1.A	1.A
Valeril klorid	638-29-9	Kloridi kiselina	1.B	1.B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Anorganske baze	1.B	1.B

▼M8

Tvar ([2])	CAS br.	Kemijski razred	*In vivo*UN GHS-u potkategorija prema ([3])	*In vitro* potkategorija prema UN GHS-u ([3])
1-(2-aminoetil)piperazin	140-31-8	Alifatski amini	1.B	1.B
Benzensulfonil klorid	98-09-9	Kloridi kiselina	1.C	1.C
N,*N*-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilini	1.C	1.C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	Alifatski amini	1.C	1.C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrilati/metakrilati	NC	NC
Natrijev bikarbonat	144-55-8	Anorganske soli	NC	NC

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

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

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

POSTUPAK

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

Ispitivanje kompatibilnosti ispitivane kemikalije

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

Test kategorizacije ispitivane kemikalije s obzirom na vremenski okvir

14. Ako je primjereno za ispitnu metodu, ispitivanu kemikaliju koja je u ispitivanju kompatibilnosti ispunila uvjete treba podvrgnuti testu kategorizacije s obzirom na vremenski okvir, tj. testu probira kojim se razlikuju slabe i jake kiseline i baze. Na primjer, u validiranoj referentnoj metodi test kategorizacije s obzirom na vremenski okvir služi za određivanje koji bi se od dva

▼M8

vremenska okvira trebao upotrijebiti na temelju toga je li otkrivena znatna kisela ili alkalna rezerva. Za utvrđivanje nagrizajućeg djelovanja i potkategorije nagrizajućeg djelovanja na kožu prema UN GHS-u trebalo bi upotrijebiti dva različita vremenska okvira, na temelju kisele ili alkalne rezerve ispitivane kemikalije.

SASTAVNICE ISPITNE METODE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

Membranska barijera

15. Membranska barijera ima dvije sastavnice: proteinski makromolekularni vodeni gel i propusnu potpornu membranu. Proteinski gel trebao bi biti nepropustan za tekućine i krute tvari, ali trebao bi moći korodirati i postati propustan. Potpuno izrađenu membransku barijeru trebalo bi pohraniti u unaprijed utvrđenim uvjetima za koje se pokazalo da onemogućuju pogoršanje kvalitete gela, npr. sušenje, rast mikroba, pomicanje, pucanje, koje bi narušilo njegovu učinkovitost. Treba utvrditi prihvatljivo vrijeme skladištenja te se pripravci membranske barijere ne koriste nakon tog razdoblja.

16. Propusna potporna membrana pruža mehaničku potporu proteinskom gelu tijekom procesa geliranja i izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Potporna membrana trebala bi spriječiti ulegnuće ili pomicanje gela i biti propusna za sve ispitivane kemikalije.

17. Proteinski gel, koji se sastoji od proteina, npr. keratina, kolagena, ili mješavine proteina, čini matricu gela i služi kao cilj za ispitivanu kemikaliju. Proteinski materijal stavlja se na površinu potporne membrane i ostavlja se da se stvori gel prije nego što se membranska barijera stavi na otopinu indikatora. Proteinski gel posvud bi trebao biti jednake debljine i gustoće te ne bi trebao sadržavati mjehuriće zraka ili nedostatke koji bi mogli utjecati na njegov funkcionalni integritet.

Detekcijski sustav za kemikalije (CDS)

18. Otopina indikatora (ista otopina koja se upotrebljavala za ispitivanje kompatibilnosti) treba reagirati u prisutnosti ispitivane kemikalije. Treba se koristiti pH-indikatorskom bojom ili kombinacijom boja, npr. krezol crvenilom i metiloranžom, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane kemikalije. Sustav mjerenja može biti vizualni ili elektronički.

19. Detekcijski sustavi razvijeni za otkrivanje prolazaka ispitivane kemikalije kroz membransku barijeru treba procijeniti u pogledu relevantnosti i pouzdanosti kako bi se utvrdio raspon kemikalija koje se mogu otkriti i kvantitativna ograničenja otkrivanja.

PROVOĐENJE TESTA

Sastavljanje sastavnica ispitne metode

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

▼M8

Primjena ispitivane kemikalije

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

Mjerenje prodiranja kroz membransku barijeru

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

Kontrole

23. Kod ispitivanja u kojima se s ispitivanom kemikalijom upotrebljava nosač ili otapalo, nosač ili otapalo treba biti kompatibilno sa sustavom membranske barijere, tj. ne smije izmijeniti integritet sustava membranske barijere ni nagrizajuće djelovanje ispitivane kemikalije. Ako je primjenjivo, kontrolu otapala (ili nosača) treba ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kako bi se dokazala kompatibilnost otapala sa sustavom membranske barijere.

24. Pozitivnu (nagrizajuću) kontrolu sa srednje nagrizajućom aktivnosti, npr. 110 ± 15 mg natrijeva hidroksida (potkategorija 1.B nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u) (7.) treba ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kako bi se procijenilo funkcionira li ispitni sustav zadovoljavajuće. Za procjenu relativnog potencijala za nagrizajuće djelovanje nagrizajuće ispitivane kemikalije može biti korisna druga pozitivna kontrola iz istog kemijskog razreda kao ispitivana kemikalija. Treba odabrati pozitivnu kontrolu ili kontrole srednje nagrizajućeg djelovanja (npr. potkategorija 1.B prema UN GHS-u) kako bi se otkrile promjene u vremenu prodiranja koje mogu biti neprihvatljivo dulje ili kraće od utvrđene referentne vrijednosti, što ukazuje na to da ispitni sustav ne funkcionira pravilno. Korisnost kemikalija koje djeluju iznimno nagrizajuće (potkategorija 1.A prema UN GHS-u) ili koje ne djeluju nagrizajuće u tu je svrhu ograničena. Nagrizajuća kemikalija iz potkategorije 1.B prema UN GHS-u omogućila bi otkrivanje predugog ili prekratkog vremena prodiranja. Kemikalija slabo nagrizajućeg djelovanja (potkategorija 1.C prema UN GHS-u) mogla bi se upotrijebiti kao pozitivna kontrola za mjerenje sposobnosti ispitne metode da dosljedno razlikuje kemikalije koje imaju slabo nagrizajuće djelovanje od kemikalija koje ne djeluju nagrizajuće. Neovisno o tome koji se pristup primjenjuje, treba razviti prihvatljivi raspon odgovora pozitivne kontrole na temelju prijašnjeg raspona vremena prodiranja za primijenjenu pozitivnu kontrolu ili kontrole, kao što je srednja vrijednost ±2–3 standardne devijacije. U svakoj studiji treba utvrditi točno vrijeme prodiranja za pozitivnu kontrolu kako bi se mogle otkriti devijacije koje su izvan prihvatljivog raspona.

25. Negativnu (nenagrizajuću) kontrolu, npr. 10-postotnu limunsku kiselinu, 6-postotnu propionsku kiselinu (7.) isto bi trebalo ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kao još jednu mjeru kontrole kvalitete za dokazivanje funkcionalnog integriteta membranske barijere.

▼M8

Kriteriji prihvatljivosti istraživanja

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

Tumačenje rezultata i razvrstavanje ispitivanih kemikalija prema nagrizajućem djelovanju

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

Tablica 3.

Model predviđanja Corrositex®

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

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

▼M8

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

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

Izvješće o ispitivanju

29. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

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

— tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

— tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

— stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

Nosač:

— identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,

— obrazloženje za odabir nosača.

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

Ispitni uvjeti:

— opis korištenog uređaja i postupaka pripreme,

— podrijetlo i sastav korištene *in vitro* membranske barijere,

— sastav i svojstva otopine indikatora,

— metoda detekcije,

— količina ispitivane kemikalije i kontrolne tvari,

— broj ponavljanja,

— opis i obrazloženje testa kategorizacije s obzirom na vremenski okvir,

▼M8

— način primjene,

— vremena opažanja,

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i razvrstavanja,

— dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

Rezultati:

— tablični prikaz pojedinačnih neobrađenih podataka o pojedinačnim ispitnim i kontrolnim uzorcima za svako ponavljanje,

— opis drugih uočenih učinaka,

— utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.

3. Poglavlje B.40.*bis* ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).

4. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).

5. OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

6. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483.–524.

7. ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495).

8. Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37.–45.

▼**M8**

9. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

10. OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

11. ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italija. ATLA 29, 96.–97.

12. U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (20. rujna 2002.). Washington, D.C., U.S. DOT.

13. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupno na: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

14. U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupno na: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

15. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Dodatak

DEFINICIJE

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

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

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

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

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

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

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

NC: nije nagrizajuće.

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

▼**M8**

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M8

B.66. *IN VITRO* TESTOVI TRANSAKTIVACIJE SA STABILNOM TRANSFEKCIJOM ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKIH RECEPTORA

OPĆI UVOD

Smjernica OECD-a za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti

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

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

— test VM7Luc ER TA (3.) uz primjenu stanične linije VM7Luc4E2 ([1]), koja većinom izražava receptor hERα uz određeni doprinos receptora hERββ(4. i 5.).

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

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za

([1]) Prije lipnja 2016. ta je stanična linija bila određena kao stanična linija BG1Luc. Stanice BG-1 izvorno su opisali Geisinger i dr. (1998.) (35.), a kasnije su ih okarakterizirali istraživači iz NIEHS-a (*National Institute of Environmental Health Sciences*) (36.). Relativno nedavno otkriveno je da postoje dvije različite varijante stanica BG-1 kojima se istraživači koriste – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Temeljita analiza, uključujući DNK ispitivanje, tih dviju varijanti staničnih linija BG-1 koju su proveli Li i suradnici (2014.) (37.) pokazala je da je BG-1 Fr jedinstven i da BG-1 NIEHS, tj. izvorna stanična linija koja se koristila za razvoj testa, nije stanična linija humanog karcinoma jajnika BG1, već varijanta stanične linije humanog karcinoma dojke MCF7. Stanična linija upotrijebljena u tom testu, koja se izvorno nazivala BG1Luc4E2 (38.), sad će se zvati VM7Luc4E2 („V” = varijanta; „M7” = stanice MCF7). Isto tako, test se sad zove VM7Luc ER TA. Iako se time mijenja podrijetlo stanične linije na kojoj se test temelji, ne utječe se na objavljene validacijske studije ni na korisnost i primjenu ovog testa za probir estrogenskih/antiestrogenskih kemikalija.

▼M8

ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okviri uključeni su kao prilozi Vodiču OECD-a o standardiziranim ispitnim smjernicama za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (8.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi ER transaktivacije (TA) opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena *in vitro* testovima transaktivacije (TA) koji su osmišljeni za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER).

3. Interakcija estrogena i estrogenskih receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, normalni razvoj fetusa i reproduktivnu funkciju (9., 10. i 11.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sustava mogao bi izazvati štetne učinke za normalni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava.

4. *In vitro* TA testovi temelje se na izravnoj ili neizravnoj interakciji tvari sa specifičnim receptorom koji regulira transkripciju proizvoda reporterskog gena. Ti se testovi u velikoj mjeri upotrebljavaju za procjenu genske ekspresije koju reguliraju specifični receptori u jezgri, kao što su estrogenski receptori (12., 13., 14., 15. i 16.). Predloženi su za otkrivanje estrogenske transaktivacije koju regulira estrogenski receptor (17., 18. i 19.). Postoje najmanje dvije glavne podvrste estrogenskih receptora u jezgri, α i β, a kodiraju ih posebni geni. Pojedini proteini imaju različite biološke funkcije te različitu distribuciju u tkivima i afinitete vezanja liganda (20., 21., 22., 23., 24., 25. i 26.). Jezgreni ERα posreduje u klasičnom estrogenskom odgovoru (27., 28., 29. i 30.) pa je stoga većina modela koji se trenutačno razvijaju za mjerenje aktivacije ili inhibicije estrogenskog receptora specifična za ERα. Testovi se upotrebljavaju za identifikaciju kemikalija koje aktiviraju (ili inhibiraju) estrogenski receptor nakon vezivanja liganda, nakon čega se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen, što dovodi do povećane stanične ekspresije markerskog proteina. U tim se testovima mogu koristiti različiti reporterski odgovori. U sustavima koji se temelje na luciferazi, enzim luciferaza pretvara supstrat luciferina u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Drugi primjeri uobičajenih reporterskih gena uključuju fluorescentni protein i gen *LacZ*, koji kodira β-galaktozidazu, enzim koji može pretvoriti bezbojni supstrat X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) u plavi proizvod koji se može kvantificirati spektrofotometrom. Ti se reporterski geni mogu procijeniti brzo i jeftino primjenom komercijalno dostupnog pribora za ispitivanje.

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

6. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

▼M8

Područje primjene TA testova i ograničenja povezana s njima

7. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i mehanicističke informacije koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Bave se transaktivacijom koju inducira kemijsko vezivanje na estrogenske receptore u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.

8. Transaktivacija koju posreduju estrogenski receptori smatra se jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije (ED), iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; ii. sintezu hormona; iii. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; iv. distribuciju hormona u ciljna tkiva i v. uklanjanje hormona iz tijela. Ni jedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.

9. Ova se ispitna metoda bavi sposobnošću kemikalija da aktiviraju (tj. djeluju kao agonisti) i da potiskuju (tj. djeluju kao antagonisti) transkripciju koja ovisi o estrogenskim receptorima. Određene kemikalije mogu pokazati i agonističko i antagonističko djelovanje ovisno o vrsti stanica i poznate su kao selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM-ovi). Kemikalije koje su u ovim testovima negativne mogle bi se procijeniti u testovima vezivanja na estrogenski receptor prije nego što se zaključi da se kemikalija ne veže na receptor. Osim toga, u ovim će se testovima vjerojatno dobiti samo podaci o aktivnosti polazne molekule, imajući na umu ograničene metaboličke mogućnosti *in vitro* staničnih sustava. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Unatoč tomu, ova je ispitna metoda u teoriji primjenjiva za ispitivanje tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na tvari s više sastojaka, UVCB tvari ili smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

10. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja agonista za 34 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari 26 ih je razvrstano kao definitivni agonisti estrogenskih receptora, a osam ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju i/ili uterotrofni test (2., 3., 18., 31., 32., 33. i 34.). U tablici 2. navedeni su rezultati ispitivanja antagonista za 15 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari četiri su razvrstane kao definitivni/pretpostavljeni antagonisti estrogenskih receptora, a deset ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju (2., 3., 18. i 31.). S obzirom na podatke sažete u tablicama 1. i 2., postojalo je 100-postotno slaganje obiju referentnih ispitnih metoda o razvrstavanju svih tvari osim jedne tvari (mifepristona) u testu antagonista i svaka je tvar točno razvrstana kao agonist/antagonist estrogenskih receptora ili kao negativna tvar. Dodatne informacije o ovoj skupini kemikalija i o dodatnim kemikalijama koje su ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za testove ER TA (6. i 7.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

▼M8

Tablica 1.

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

	Tvar	CAS br.	STTA test (1)			VM7Luc ER TA test (2)		Izvor podataka za razvrstavanje (4)		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC_{10} (M)	Vrijednost PC_{50} (b) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC_{50} (b), (3) (M)	Ostali ER TA-ovi (c)	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiol (a)	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NI	NI
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol (a)	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NI
7	4-*tert*-oktilfenol (a)	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin (a)	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NI
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NI
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	Benzil-butil-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

▼M8

	Tvar	CAS br.	STTA test [1]			VM7Luc ER TA test [2]		Izvor podataka za razvrstavanje [4]		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC_{10} (M)	Vrijednost PC_{50} [b] (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC_{50} [b], [3] (M)	Ostali ER TA-ovi [c]	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
13	Kortikosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NI
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	NI
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	NI
17	Di-*n*-butil-ftalat	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(bez PC_{50})	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NI
19	Estron [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
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
22	Kemferol [a]	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NI
23	Kepon [a]	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NI
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
25	Linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NI
26	*Mezo*-heksestrol [a]	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NI
27	Metil testosteron [a]	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NI

▼M8

	Tvar	CAS br.	STTA test ([1])			VM7Luc ER TA test ([2])		Izvor podataka za razvrstavanje ([4])		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC_{10} (M)	Vrijednost PC_{50} ([b]) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Ostali ER TA-ovi ([c])	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
28	Morin	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NI
29	Noretinodrel ([a])	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NI
30	*p,p*'-metoksiklor ([a])	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(bez PC_{50}) ([a])	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
33	Spironolakton ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
34	Testosteron	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NI

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

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

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

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

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

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

([3]) Srednje vrijednosti EC_{50} izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

([4]) Razvrstavanje kao agonist estrogenskog receptora ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ovih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD; *Background Review Documents*) za ispitne metode vezivanja estrogenskih receptora i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18., 31., 33. i 34.).
Napomene: u svakom testu u okviru ove ispitne metode ne koriste se ista mjerenja. U nekim se situacijama ne može izračunati EC_{50} jer nije generirana cijela krivulja doza i reakcija. Dok je u STTA testu vrijednost PC_{10} ključno mjerenje, mogu postojati i drugi primjeri u kojima će PCx dati korisne informacije.

▼M8

Tablica 2.

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

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

▼M8

	Tvar ([a])	CAS br.	ER STTA test ([1])		VM7Luc ER TA test ([2]) Mogući učinci testa		ER STTA ([4])	ICCVAM-ovo ([5]) sporazumno razvrstavanje Kemijski razred	prema MeSH-u ([6])	Razred proizvoda ([7])
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} ([b]) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklički spoj	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuproizvod
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterociklički spoj	Herbicid
9	Di-*n*-butil-ftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska kemikalija, plastifikator
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	PN	Heterociklički spoj, pirimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod

▼M8

	Tvar ([a])	CAS br.	ER STTA test ([1])		VM7Luc ER TA test ([2]) Mogući učinci testa		ER STTA ([4])	ICCVAM-ovo ([5]) sporazumno razvrstavanje Kemijski razred	prema MeSH-u ([6])	Razred proizvoda ([7])
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} ([b]) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	*p-n*-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuproizvod
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC_{50} = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno; PP = pretpostavlja se da je pozitivno.

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

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

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

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

([3]) Srednje vrijednosti IC_{50} izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

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

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

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

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

▼M8

SASTAVNICE ER TA TESTA

Ključne sastavnice testa

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

Kontrole

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

Standardni postupci kontrole kvalitete

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

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

14. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa. Kako bi dokazao osposobljenost, svaki bi laboratorij trebao ispitati 14 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u tablici 3. za test agonista i 10 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz tablice 4. za test antagonista. To ispitivanje osposobljenosti potvrdit će i osjetljivost ispitnog sustava. Popis tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za ER TA testove (6.). Te su tvari komercijalno dostupne, čine razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću agonista ili antagonista estrogenskih receptora, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za agoniste/antagoniste estrogenskih receptora (tj. slabi do jaki) i uključuju negativne tvari. Ispitivanje tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti treba se ponoviti barem dvaput na različite dane. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba dvaput ponoviti ispitivanje osposobljenosti. Ovisno o vrsti stanica neke se od tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti mogu ponašati kao SERM-ovi i pokazivati aktivnosti i kao agonisti i antagonisti. Međutim, tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti u tablicama 3. i 4. razvrstane su prema poznatoj dominantnoj aktivnosti koja bi se trebala koristiti za procjenu osposobljenosti.

15. Kako bi se dokazala uspješnost i u svrhe kontrole kvalitete svaki bi laboratorij trebao izraditi bazu podataka prijašnjih agonista i antagonista s podacima o referentnoj normi (npr. 17β-estradiol i tamoksifen), pozitivnim i negativnim kontrolnim kemikalijama i kontroli s otapalom (npr. DMSO). Za početak, bazu podataka treba izraditi iz najmanje deset neovisnih ciklusa ispitivanja agonista (npr. 17β-estradiola) i deset neovisnih ciklusa ispitivanja antagonista (npr. tamoksifena). Rezultate iz budućih analiza tih referentnih normi i kontrola s otapalom treba dodati kako bi se povećala baza podataka i osigurala dosljednost i uspješnost laboratorija u provedbi biotestova tijekom vremena.

▼M8

Tablica 3.

Popis (14) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test agonista ([1])

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

▼M8

Br. ([8])	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor ([2])	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijski razred prema MeSH-u ([6])	Razred proizvoda ([7])
				Vrijednost PC_{10} (M) ([3])	Vrijednost PC_{50} (M) ([3])	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC_{50} u VM7Luc (M) ([4])	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ([5])		
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod
3	Benzil-butil-ftalat	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboksilna kiselina, ester, ftalna kiselina	Plastifikator, industrijska kemikalija
4	*p,p*'-metoksiklor	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Ugljikovodik (halogenirani)	Pesticid, veterinarski proizvod
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboksilna kiselina, fenol	Farmaceutski proizvod, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklički spoj	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Farmaceutski proizvod
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklički spoj	Farmaceutski proizvod

▼M8

Br. ([8])	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor ([2])	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijski razred prema MeSH-u ([6])	Razred proizvoda ([7])
				Vrijednost PC_{10} (M) ([3])	Vrijednost PC_{50} (M) ([3])	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC_{50} u VM7Luc (M) ([4])	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ([5])		
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, indol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod

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

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

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

([3]) Srednje vrijednosti EC_{50} izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

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

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

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

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

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

▼M8

Tablica 4.

Popis (10) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test antagonista

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

▼M8

	Tvar ([a])	CAS br.	ER STTA test ([1])			VM7Luc ER TA test ([2])			Mogući učinci testa ER STTA ([1])	ICCVAM-ovo ([5]) sporazumno razvrstavanje	Kemijski razred prema MeSH-u ([6])	Razred proizvoda ([7])
			ER TA aktivnost	IC_{50} (M)	Raspon ispitnih konc. (M)	ER TA aktivnost	IC_{50} ([3]) (M)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno (*)	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno (*)	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
9	*p-n*-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuproizvod
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	vjerojatno negativno (*)	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC_{50} = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno.

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

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

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

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

([3]) Srednje vrijednosti IC_{50} izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

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

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

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

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

▼M8

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

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

— potrebno je dovoljno podataka za kvantitativnu procjenu aktivacije (za test agonista) ili potiskivanja (za test antagonista) estrogenskog receptora (tj. učinkovitost i jakost),

— srednja reporterska aktivnost za referentnu koncentraciju referentnog estrogena treba biti barem minimum utvrđen u testovima u odnosu na aktivnost kontrole s nosačem (otapalom) kako bi se osigurala primjerena osjetljivost. Za STTA i VM7Luc ER TA testove to je četiri puta više od srednje kontrole s nosačem na svakoj ploči,

— ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivanih kemikalija i ne bi smjele pokazivati citotoksičnost.

Analiza podataka

17. Za razvrstavanje pozitivnih i negativnih odgovora treba upotrebljavati utvrđeni postupak za tumačenje podataka za svaki test.

18. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 16.) znači da test pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus ispitivanja dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci. Ako se u dva ciklusa dobiju ponovljivi rezultati (npr. rezultati u oba ciklusa ispitivanja pokazuju da je ispitivana kemikalija pozitivna), ne treba provoditi treći ciklus.

19. Ako se u dva ciklusa ne dobiju ponovljivi rezultati (npr. ispitivana kemikalija pozitivna je u jednom ciklusu, a negativna u drugom) ili ako je potreban veći stupanj sigurnosti u pogledu ishoda testa, treba provesti najmanje tri neovisna ciklusa. U tom se slučaju razvrstavanje temelji na dva sukladna rezultata od tri.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

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

▼**M8**

Izvješće o ispitivanju

21. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

— korišteni test,

— kontrolna/referentna norma/ispitivana kemikalija,

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Otapalo/nosač:

— karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),

— obrazloženje za odabir otapala/nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Stanice:

— vrsta i izvor stanica:

  • je li estrogenski receptor izražen endogeno? Ako nije, koji su receptori transficirani,

  • korišteni konstrukti reporterskih gena (uključujući izvornu vrstu),

  • metoda transfekcije,

  • metoda odabira za održavanje stabilne transfekcije (ako je primjenjivo),

  • je li metoda transfekcije relevantna za stabilne linije,

— Broj pasaža stanica (od odmrzavanja),

▼M8

— Broj pasaža stanica pri odmrzavanju,

— metode održavanja staničnih kultura.

Ispitni uvjeti:

— ograničenja topljivosti,

— opis metoda primijenjenih za procjenu vijabilnosti,

— sastav medija, koncentracija CO_2,

— koncentracije ispitivane kemikalije,

— volumen dodanog nosača i ispitivane kemikalije,

— temperatura i vlažnost inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— gustoća stanica na početku i za vrijeme tretiranja,

— pozitivne i negativne referentne norme,

— reporterski reagensi (naziv proizvoda, dobavljač i serija),

— kriteriji na temelju kojih se ciklusi ispitivanja smatraju pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

— multiplikacijski faktori indukcije za svaku ploču testa i ispunjavaju li najmanju vrijednost za test na temelju prijašnjih kontrola,

— stvarne vrijednosti za kriterije prihvatljivosti, npr. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne norme.

Rezultati:

— neobrađeni i normirani podaci,

— najveća razina multiplikacijskog faktora indukcije,

— podaci o citotoksičnosti,

— ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC),

— vrijednosti RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} i/ili EC_{50}, prema potrebi,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

▼**M8**

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

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

4. Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): str. 5367.–73.

5. Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): str. 67.–82.

6. OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

8. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

9. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20.–6.

10. Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): str. 1073.–89.

11. Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): str. 63.–6.

▼**M8**

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 ß - 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 ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): str. 122.–126.

22. Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): str. 4258.–4265.

23. Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): str. 204.–211.

24. Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): str. 105.–12.

25. Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): str. 1703.–1714.

26. Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): str. 558.–568.

27. Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): str. 1460.–1468.

▼**M8**

28. Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): str. 515.–522.

29. Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: str. 45.–80.

30. Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): str. 547.–569.

31. ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

32. Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785.–94.

33. Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530.–1549.

34. Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550.–1558.

35. Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280.–288.

36. Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649.–654.

37. Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072.–2081.

38. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67.–82.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

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

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

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

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

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

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

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

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

CV: koeficijent varijacije.

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

DMEM: Dulbeccov modificirani Eagleov medij.

DMSO: dimetilsulfoksid.

E2: 17β-estradiol.

EC_{50}: pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije.

ED: endokrina disrupcija.

hERα: ljudski estrogenski receptor alfa.

▼M8

hERß: ljudski estrogenski receptor beta.

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

ER: estrogenski receptor.

ERE: element odgovora estrogena.

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

ERTA: transaktivacija estrogenskog receptora.

FBS: fetalni goveđi serum.

HeLa: imortalizirana stanična linija humanog cervikalnog karcinoma.

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

IC_{50}: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

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

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

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

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

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

MT: metalotionein.

MMTV: virus mišjeg tumora dojke.

OHT: 4-hidroksitamoksifen.

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

▼**M8**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RLU: relativne jedinice svjetlosti.

RNK: ribonukleinska kiselina.

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

▼M8

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

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

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

SD: standardna devijacija.

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M8

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

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

Transkripcija: sinteza molekula mRNA.

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

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

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

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

VM7: imortalizirana stanica adenokarcinoma koja endogeno eksprimira estrogenski receptor.

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

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

▼**M8**

Dodatak 2.

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

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom testu transaktivacije (TA) upotrebljava se stanična linija hERα-HeLa-9 903 radi otkrivanja estrogenskog agonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα). Validacijska studija testa transaktivacije sa stabilnom transfekcijom (STTA) koju je proveo CERI (Japanski institut za procjenu i istraživanje kemikalija) primjenom stanične linije hERα-HeLa-9 903 za otkrivanje estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.).

2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hERα mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Međutim, pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μM zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (2. i 3.). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom (Dodatak 1.).

3. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 2.1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

4. Test se upotrebljava za signalizaciju vezivanja estrogenskog receptora s ligandom. Nakon vezivanja s ligandom kompleks receptora i liganda translocira u jezgru, gdje se veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu krijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Luciferin je supstrat koji enzim luciferaze pretvara u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje.

5. U ispitnom sustavu upotrebljava se stanična linija hERα-HeLa-9 903, koja se dobiva iz humanog cervikalnog tumora, s dva stabilno umetnuta konstrukta: i. konstruktom za ekspresiju hERαα (kodiranje cijelog ljudskog receptora) i ii. konstruktom reporterskog gena za luciferazu krijesnice koji nosi pet tandemskih ponavljanja elementa vitelogenina koji reagira na estrogen (ERE) koje pokreće TATA element promotora gena za mišji metalotionein (MT). Pokazalo se da je mišji MT TATA genski konstrukt najuspješniji pa se često upotrebljava. Stoga ova stanična linija hERα-HeLa-9 903 može mjeriti sposobnost ispitivane kemikalije da inducira transaktivaciju genske ekspresije luciferaze kojom posreduje hERα.

▼M8

6. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome je li maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija jednaka ili veća od odgovora agonista koji iznosi 10 % odgovora koji inducira koncentracija pozitivne kontrole 17β-estradiola (E2) s najvećim učinkom (1 nM) (tj. PC10). U slučaju testa antagonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome pokazuje li odgovor smanjenje aktivnosti od najmanje 30 % u odnosu na odgovor koji inducira kontrola s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 pM E2) bez pojave citotoksičnosti. O analizi i tumačenju podataka podrobno se raspravlja u stavcima od 34. do 48.

POSTUPAK

Stanične linije

7. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija hERα-HeLa-9 903. Stanična linija može se dobiti iz banke stanica JCRB-a (Japanese Collection of Research Bioresources, Japanska zbirka istraživačkih bioresursa) ([1]) nakon potpisivanja sporazuma o prijenosu materijala (MTA).

8. U ispitivanju se trebaju upotrebljavati samo stanice koje ne sadržavaju mikoplazmu. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) preferirana je metoda za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom (4., 5. i 6.).

Stabilnost stanične linije

9. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije, kao referentne norme za test agonista treba upotrebljavati E2, 17α-estradiol, 17α-metiltestosteron i kortikosteron te treba izmjeriti cijelu krivulju koncentracija – odgovor u rasponu ispitne koncentracije navedenom u tablici 1. barem jednom kod svake provedbe testa, a rezultati bi se trebali slagati s rezultatima navedenima u tablici 1.

10. U slučaju testa antagonista, pri svakom ciklusu treba istodobno mjeriti cijele krivulje koncentracije za dvije referentne norme, tamoksifen i flutamid. Treba pratiti točno kvalitativno razvrstavanje tih dviju kemikalija kao pozitivnih i negativnih.

Stanična kultura i uvjeti nasađivanja

11. Stanice treba održavati u Eagleovu minimalnom esencijalnom mediju (EMEM) bez fenolne crvene, obogaćenom sa 60 mg/l antibiotika kanamicina i 10 % fetalnog goveđeg seruma tretiranog ugljenom premazanim dekstranom (DCC-FBS), u inkubatoru CO_2 (5 % CO_2) na 37 ± 1 °C. Kada se postigne konfluencija od 75 do 90 %, može se uzgojiti supkultura po 10 ml 0,4 x 105 – 1 x 105 stanica/ml za zdjelicu sa staničnom kulturom od 100 mm. Stanice treba suspendirati u 10 % medija FBS-EMEM (što je isto kao i EMEM s DCC-FBS-om) i zatim nasaditi u jažice mikroploče pri gustoći od 1 x 104 stanica/(100 µl x jažica). Stanice zatim treba predinkubirati u inkubatoru s 5 % CO_2 na 37 ± 1 °C u trajanju od tri sata prije izlaganja kemikaliji. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti.

12. Kako bi se održao integritet odgovora, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u kondicioniranom mediju i ne bi se trebale uzgajati za više od 40 pasaža. Za staničnu liniju hERα-HeLa-9 903 to će trajati manje od tri mjeseca. Međutim, uspješnost stanica može se smanjiti ako se one uzgajaju u uvjetima koji nisu primjereni za uzgoj kulture.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, faks: +81 726419812.

▼M8

13. DCC-FBS se može pripremiti kako je opisano u Dodatku 2.2. ili se može nabaviti iz komercijalnih izvora.

Kriteriji prihvatljivosti

Pozitivne i negativne referentne norme za test agonista estrogenskog receptora

14. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija jakog estrogena: E2, slabog estrogena (17α-estradiol), vrlo slabog agonista (17α-metiltestosteron) i negativne tvari (kortikosteron). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 1. Ove četiri paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti unutar prihvatljivih ograničenja. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija prihvatljivosti (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti EC_{50}, PC_{50} i PC_{10}. S pomoću četiriju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa jer vrijednosti PC10 triju pozitivnih referentnih normi trebaju biti unutar prihvatljivog raspona, isto kao i vrijednosti PC_{50} i EC_{50} ako se mogu izračunati (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 1.

Vrijednosti prihvatljivog raspona četiriju referentnih normi za test agonista estrogenskog receptora

Naziv	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillov nagib	Raspon ispitivanja
17β-estradiol (E2) CAS br.: 50-28-2	–11,4 ~ –10,1	< –11	–11,3 ~ –10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8} M
17α-estradiol CAS br.: 57-91-0	–9,6 ~ –8,1	–10,7 ~ –9,3	–9,6 ~ –8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6} M
Kortikosteron CAS br.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10} ~ 10^{-4} M
17α-metiltestosteron CAS br.: 58-18-4	–6,0 ~ –5,1	–8,0 ~ –6,2	—	—	10^{-11} ~ 10^{-5} M

Pozitivne i negativne referentne norme za test antagonista estrogenskog receptora

15. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija pozitivne tvari (tamoksifen) i negativne tvari (flutamid). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 2. Ove dvije paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti procijenjeni točnima, kako je prikazano u kriterijima. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Osim toga, treba izračunati vrijednosti IC_{50} za pozitivnu tvar (tamoksifen) i rezultati bi trebali biti unutar utvrđenih prihvatljivih ograničenja. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti IC_{50}. S pomoću tih dviju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa (vidjeti tablicu 2.).

▼M8

Tablica 2.

Kriteriji i vrijednosti prihvatljivog raspona dviju referentnih normi za test antagonista estrogenskog receptora

Naziv	Kriteriji	$LogIC_{50}$	Raspon ispitivanja
Tamoksifen CAS br.: 10 540-29-1	Pozitivno: treba izračunati IC_{50}	–5,942 ~ –7,596	10–10 ~ 10–5 M
Flutamid CAS br.: 13 311-84-7	Negativno: ne treba izračunati IC_{30}	—	10–10 ~ 10–5 M

Pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

16. Pozitivnu kontrolu (PC) za test agonista estrogenskog receptora (1 nM E2) i za test antagonista estrogenskog receptora (10 μM tamoksifena) treba ispitati najmanje u tri ponavljanja na svakoj ploči. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivane kemikalije treba ispitati kao kontrolu s nosačem (VC) barem u tri ponavljanja na svakoj ploči. Osim te kontrole s nosačem, ako se u pozitivnoj kontroli upotrebljava nosač različit od onoga koji se upotrebljava s ispitivanom kemikalijom, treba ispitati drugu kontrolu s nosačem u najmanje tri ponavljanja na istoj ploči s pozitivnom kontrolom.

Kriteriji kvalitete za test agonista estrogenskog receptora

17. Srednja aktivnost luciferaze u pozitivnoj kontroli (1 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije (prema prijašnjim podacima četiri do 30 puta više).

18. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, multiplikacijski faktor indukcije koji odgovara vrijednosti PC10 istodobne pozitivne kontrole (1 nM E2) trebao bi biti veći od 1 + 2 standardne devijacije vrijednosti multiplikacijskog faktora indukcije (= 1) istodobne kontrole s nosačem. U svrhu određivanja prioriteta, vrijednost PC_{10} može biti korisna za pojednostavnjenje potrebne analize podataka u usporedbi sa statističkom analizom. Iako statistička analiza pruža podatke o značajnosti, ta analiza nije kvantitativan parametar u pogledu potencijala koji se temelji na koncentraciji i stoga je manje korisna u svrhu određivanja prioriteta.

Kriteriji kvalitete za test antagonista estrogenskog receptora

19. Srednja aktivnost luciferaze u kontroli s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije.

20. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 treba biti veća od 100 %, RTA 1 μM 4-hidroksitamoksifena (OHT) treba biti manji od 40,6 % i RTA 100 μM digitonina (Dig) treba biti manji od 0 %.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode).

Nosač

21. Kao istodobnu kontrolu s nosačem treba upotrijebiti dimetilsulfoksid (DMSO) ili primjereno otapalo, u istoj koncentraciji koja se upotrebljava za različite pozitivne i negativne kontrole i ispitivane kemikalije. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 0,1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječu na uspješnost testa.

▼M8

Priprema ispitivanih kemikalija

22. Ispitivane kemikalije obično treba otopiti u DMSO-u ili drugom primjerenom otapalu i serijski razrijediti istim otapalom u omjeru 1: 10 kako bi se pripremile otopine za razrjeđivanje s medijem.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

23. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdio primjereni raspon koncentracije kemikalije koja se ispituje i kako bi se utvrdilo postoje li određeni problemi povezani s topljivosti i citotoksičnosti ispitivane kemikalije. Kemikalije se u početku ispituju do najveće koncentracije od 1 μl/ml, 1 mg/ml ili 1 mM, ovisno o tome što je najmanje. Na temelju mjere citotoksičnosti ili nedovoljne topljivosti uočene u preliminarnom ispitivanju, u prvom definitivnom ciklusu kemikaliju treba ispitati po log-serijskim razrjeđenjima, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM, 100 μM, 10 μM itd.) i zabilježiti zamućenje, talog ili citotoksičnost. Koncentracije u drugom, a prema potrebi i trećem ciklusu treba po potrebi prilagoditi radi bolje karakterizacije krivulje koncentracija – odgovor i kako bi se izbjegle koncentracije za koje se utvrdi da nisu topljive ili da induciraju preveliku citotoksičnost.

24. Kod agonista i antagonista estrogenskog receptora prisutnost povećanih razina citotoksičnosti može znatno izmijeniti ili eliminirati uobičajeni sigmoidni odgovor i treba je uzeti u obzir pri tumačenju podataka. Treba upotrebljavati metode za ispitivanje citotoksičnosti koje mogu dati informacije o 80-postotnoj vijabilnosti stanica, uz primjenu primjerenog testa na temelju iskustva laboratorija.

25. Ako rezultati ispitivanja citotoksičnosti pokažu da je koncentracija ispitivane kemikalije smanjila broj stanica za 20 % ili više, ta se koncentracija treba smatrati citotoksičnom, a koncentracije koje su jednake citotoksičnoj koncentraciji ili veće treba isključiti iz procjene.

Izlaganje kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Postupak za razrjeđivanja kemikalija (koraci 1. i 2.) i izlaganje stanica (korak 3.) može se provoditi na sljedeći način.

Korak 1.: Svaku ispitivanu kemikaliju treba serijski razrijediti u DMSO-u ili primjerenom otapalu i dodati u jažice mikrotitracijske pločice kako bi se dobile konačne serijske koncentracije kako su utvrđene u preliminarnom ispitivanju za utvrđivanje raspona (obično u serijama, na primjer 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) za ispitivanje u tri ponavljanja.

Korak 2.: razrjeđivanje kemikalija: prvo razrijediti 1,5 μl ispitivane kemikalije u otapalu na volumen od 500 μl medija.

Korak 3.: izlaganje stanica kemikaliji: dodati 50 μl razrijeđene kemikalije s medijem (pripremljene u koraku 2.) u testnu jažicu koja sadržava 104 stanica/100 μl/jažica.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 150 μl. Ispitni uzorci i referentne norme mogu se rasporediti kako je prikazano u tablici 3. i tablici 4.

▼M8

Tablica 3.

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči za agonist estrogenskog receptora

Redak	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 s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

27. Referentne norme (E2, 17α-estradiol, 17 α-metil testosteron i kortikosteron) treba ispitati u svakom ciklusu (tablica 3.). Jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje mogu proizvesti najveću indukciju E2 te jažice s kontrolom nosača tretirane samo DMSO-om (ili primjerenim otapalom) treba uključiti u svaku testnu ploču u ispitivanju (tablica 4.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

Tablica 4.

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči u testu agonista estrogenskog receptora

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

Tablica 5

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči u testu antagonista estrogenskog receptora

Redak	Tamoksifen			Flutamid			Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 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-a	→	→	→	→	→	1 µM OHT-a	→	→	100 µM digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifena; Dig: digitonin.

= dodano 25 pM E2

28. Kako bi se procijenilo antagonističko djelovanje kemikalija, u testne jažice koje se nalaze u recima od A do G treba dodati 25 pM E2. Referentne norme (tamoksifen i flutamid) treba ispitati u svakom ciklusu. Svaka testna ploča u ispitivanju treba uključivati jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje se mogu upotrijebiti kao kontrola kvalitete za staničnu liniju hERα-HeLa-9 903, jažice s kontrolom nosača tretirane DMSO-om (ili odgovarajućim otapalom), jažice s 0,1 % DMSO-a tretirane dodatkom DMSO-a i E2 koje odgovaraju kontroli s dodanom poznatom količinom tvari („*spike-in*” kontrola), jažice tretirane s konačnom koncentracijom 1 µM OHT-a te jažice tretirane s 100 µM digitonina (tablica 5.). Kod kasnijih testnih ploča treba se slijediti isti raspored na ploči bez jažica iz referentnih normi (tablica 6.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

▼M8

Tablica 6

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči za antagonist estrogenskog receptora

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 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-a	→	→	→	→	→	1 μM OHT-a	→	→	100 μM digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifen, Dig: digitonin.

: dodano 25 pM E2

29. Prema potrebi treba potvrditi izostanak rubnih učinaka, a ako se sumnja na rubne učinke, treba promijeniti raspored na ploči kako bi se izbjegli ti učinci. Na primjer, može se upotrijebiti raspored na ploči koji isključuje rubne jažice.

30. Nakon dodavanja kemikalija testne ploče treba inkubirati u inkubatoru s 5 % CO_2 na 37 ± 1 °C od 20 do 24 sata kako bi se inducirali proizvodi reporterskog gena.

31. Posebnu pozornost treba posvetiti spojevima koji su jako hlapljivi. U tim slučajevima kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate i to treba uzeti u obzir u kontekstu očekivanih i prijašnjih vrijednosti kontrola. U nekim slučajevima u kojima hlapljivost može biti problem mogu se upotrijebiti poklopci za ploče kako bi se tijekom ispitivanja učinkovito izolirale pojedinačne jažice pa se stoga u tim slučajevima preporučuje njihova upotreba.

32. Ponavljanja konačnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost.

Test luciferaze

33. Za test se može upotrijebiti komercijalni reagens za test luciferaze [npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ili ekvivalentno)) ili standardni sustav testa luciferaze (npr. Promega, E1500 ili ekvivalentno) pod uvjetom da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti. Reagens za test treba odabrati na temelju osjetljivosti luminometra koji se koristi. Ako se koristi standardni sustav testa luciferaze, prije dodavanja supstrata treba upotrijebiti reagens za liziranje stanične kulture. Reagens za luciferazu treba primijeniti prema uputama proizvođača.

ANALIZA PODATAKA

Test agonista estrogenskog receptora

34. Kad je riječ o testu agonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu (1 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci):

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

▼M8

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu pozitivnu kontrolu.

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane pozitivne kontrole (PC = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom pozitivne kontrole.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svaku koncentracijsku skupinu ispitivane kemikalije. Odgovor ima dvije dimenzije: prosječnu transkripcijsku aktivnost (odgovor) i koncentraciju pri kojoj dolazi do odgovora (vidjeti sljedeći odjeljak).

Razmatranja o indukciji vrijednosti EC_{50}, PC_{50} i PC_{10}

35. Za izračun vrijednosti EC_{50} potrebna je cijela krivulja koncentracija – odgovor, ali to se ne može uvijek postići ili nije praktično zbog ograničenja raspona ispitne koncentracije (na primjer, zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti). Međutim, budući da su EC_{50} i najveća razina indukcije (koja odgovara najvećoj vrijednosti Hillove jednadžbe) informativni parametri, treba ih navesti kada je to moguće. Za izračun vrijednosti EC_{50} i najveće razine indukcije treba koristiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad Prism). Ako je na podatke o koncentraciji i odgovoru primjenjiva Hillova logistička jednadžba, vrijednost EC_{50} treba izračunati prema sljedećoj jednadžbi (7.):

$Y = dno + (vrh - dno) / (1 + 10 \exp((\log EC_{50} - X) \times Hillov\ nagib))$ pri čemu je:

X logaritam koncentracije, a

Y odgovor te Y počinje na dnu i kreće se do vrha sigmoidne krivulje. Dno je u Hillovoj logističkoj jednadžbi utvrđeno na nulu.

36. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti sljedeće:

RPC_{Max} (maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija, izražena kao postotak odgovora koji inducira 1 nM E2 na istoj ploči) te PC_{Max} (koncentracija povezana s vrijednosti RPC_{Max}) i,

u slučaju pozitivnih kemikalija, koncentracije koje induciraju PC_{10} i, ako je primjereno, PC_{50}.

37. Vrijednost PCx može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti PCx. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti PCx imaju koordinate (a,b) i (c,d), vrijednost PCx može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

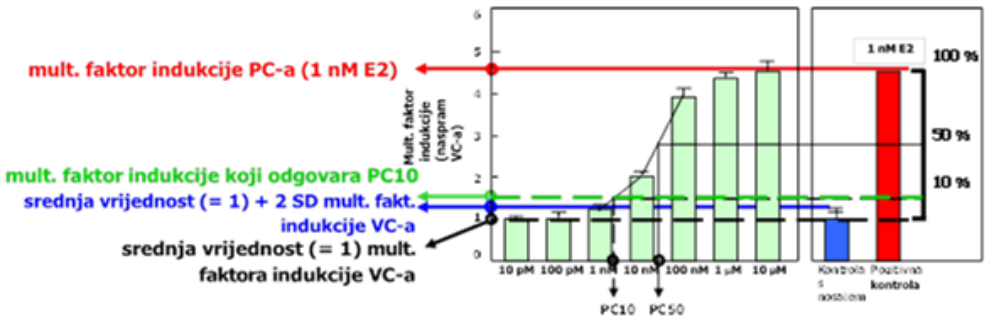
$\log[PCx] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$

▼M8

38. Opisi vrijednosti PC navedeni su na slici 1. u nastavku.

Sliika 1

Primjer načina na koji se izvode vrijednosti pozitivne kontrole. PC (1 nM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



Test antagonista estrogenskog receptora

39. Kad je riječ o testu antagonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci).

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali. Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*).

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in* kontrola = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom kontrole s dodanom poznatom količinom tvari.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svako tretiranje.

Razmatranja o indukciji vrijednosti IC_{30} i IC_{50}

40. U slučaju pozitivnih kemikalija treba navesti koncentracije koje induciraju IC_{30} i, ako je primjereno, IC_{50}.

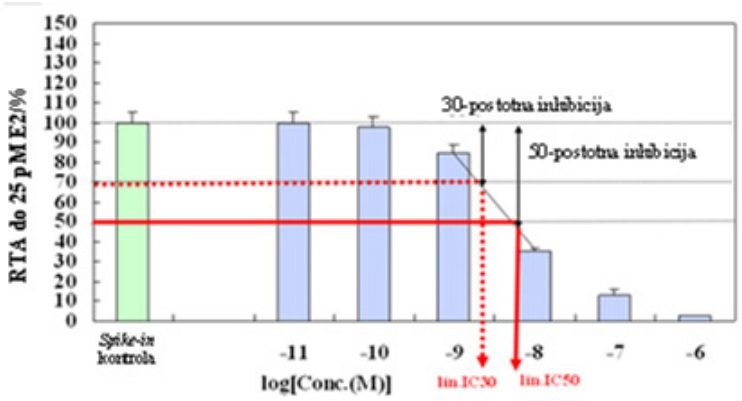
41. Vrijednost ICx može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti ICx. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti ICx imaju koordinate (c,d) i (a,b), vrijednost ICx može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{lin ICx} = a - (b - (100 - x))\,(a - c) / (b - d)$$

▼M8

Slika 2

Primjer načina na koji se izvode vrijednosti IC. Kontrola s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 pM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



RTA: relativna transkripcijska aktivnost

42. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 20. o kriterijima prihvatljivosti),

— biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

Tablica 7.

Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu agonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se dobije vrijednost RPC_{Max} koja je jednaka ili veća od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se ne uspije dobiti vrijednost RPC_{Max} koja iznosi barem 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

Tablica 8.

Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu antagonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se IC_{30} izračuna u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se IC_{30} ne uspije izračunati u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

▼**M8**

43. Kriteriji za tumačenje podataka navedeni su u tablicama 7. i 8. Pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Oba ta cilja ostvaruju se izražavanjem rezultata kao koncentracije pri kojoj se postiže 50 % (PC_{50}) ili 10 % (PC_{10}) vrijednosti PC za test agonista te se inhibira 50 % (IC_{50}) ili 30 % (IC_{30}) vrijednosti kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) za test antagonista. Međutim, ispitivana kemikalija određuje se kao pozitivna ako je najveći odgovor koji ona inducira (RPC_{Max}) jednak ili veći od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili dva od tri provedena ciklusa, dok se ispitivana kemikalija smatra negativnom ako RPC_{Max} ne uspije ostvariti 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

44. Vrijednosti PC_{10}, PC_{50} i PC_{Max} u testu agonista estrogenskog receptora te IC_{30} i IC_{50} u testu antagonista estrogenskog receptora mogu se izračunati s pomoću proračunske tablice koja je dostupna sa Smjernicom za ispitivanje na javnom web-mjestu OECD-a ([1]).

45. Trebalo bi biti dovoljno dobiti vrijednosti PC_{10} ili PC_{50} i IC_{30} ili IC_{50} najmanje dva puta. Međutim, ako osnovica za podatke u istom rasponu koncentracije koja iz toga proizađe pokazuje varijabilnost s neprihvatljivo visokim koeficijentom varijacije (CV; %), podaci se ne mogu smatrati pouzdanima i treba utvrditi izvor velike varijabilnosti. Koeficijent varijacije neobrađenih podataka iz tri ponavljanja (tj. podaci o intenzitetu fluorescencije) podatkovnih točaka koje se upotrebljavaju za izračun vrijednosti PC_{10} treba biti manji od 20 %.

46. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci.

47. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, ako je za ispitivanje za pozitivne ispitivane kemikalije, osobito za kemikalije PC10-PC49 te kemikalije za koje se sumnja da pretjerano stimuliraju luciferazu, potrebno više informacija u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta ove smjernice za ispitivanje, upotrebom antagonista ERα može se potvrditi da je uočena aktivnost luciferaze isključivo odgovor specifičan za ERα (vidjeti Dodatak 2.1.).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

48. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol., 71, 1 459.–1 469.

3. Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol*., 139, 4 252.–4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

4. Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89.–94.

5. Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769.–71.

6. Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, Appl. Environ. *Microbiol.*, 60(3), 953.–9.

7. De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97.–El02.

▼M8

Dodatak 2.1.

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: PROCJENA SIGNALA LUMINISCENCIJE KOJIMA NE POSREDUJU RECEPTORI

1. Lažno pozitivne rezultate u testu agonista estrogenskog receptora može uzrokovati aktivacija gena luciferaze koja nije posredovana estrogenskim receptorom ili izravna aktivacija genskog produkta ili nepovezana fluorescencija. Na takve učinke upućuje nepotpuna ili neobična krivulja doza – odgovor. Ako se sumnja na takve učinke, treba ispitati učinak antagonista estrogenskog receptora (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri koncentraciji koja nije toksična) na odgovor. U tu svrhu možda neće biti primjeren čisti antagonist ICI 1827 80 jer dovoljna koncentracija antagonista ICI 1827 80 može smanjiti vrijednost kontrole s nosačem, a to će utjecati na analizu podataka.

2. Kako bi se osigurala valjanost ovog pristupa, na istoj se ploči mora ispitati:

   — agonističko djelovanje nepoznate kemikalije sa/bez 10 μM OHT-a,

   — kontrola s nosačem (tri ponavljanja),

   — OHT (tri ponavljanja),

   — 1 nM E2 (tri ponavljanja) kao agonistička pozitivna kontrola,

   — 1 nM E2 + OHT (tri ponavljanja).

Kriteriji za tumačenje podataka

Napomena: sve jažice treba tretirati istom koncentracijom nosača.

— Ako tretiranje antagonistom estrogenskog receptora NE utječe na agonističko djelovanje nepoznate kemikalije, ona se razvrstava kao „negativna”.

— Ako je agonističko djelovanje nepoznate kemikalije potpuno inhibirano, primjenjuju se kriteriji za donošenje odluke.

— Ako je agonističko djelovanje pri najmanjoj koncentraciji jednako ili veće od odgovora PC_{10}, nepoznata kemikalija inhibirana je jednako ili više od odgovora PC_{10}. Računa se razlika u odgovorima između jažica koje nisu tretirane i koje su tretirane agonistom estrogenskog receptora i tu razliku treba smatrati stvarnim odgovorom i koristiti za izračun odgovarajućih parametara kako bi se omogućilo donošenje odluke o razvrstavanju.

Analiza podataka

Provjeriti zahtjeve izvedbe.

Provjeriti koeficijent varijacije između jažica tretiranih u istim uvjetima.

1. Izračunati srednju vrijednost kontrole s nosačem.

2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja nije tretirana OHT-om.

3. Izračunati srednju vrijednost OHT-a.

4. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja je tretirana OHT-om.

5. Izračunati srednju vrijednost pozitivne kontrole.

6. Izračunati relativnu transkripcijsku aktivnost svih ostalih jažica u odnosu na pozitivnu kontrolu.

▼**M8**

Dodatak 2.2.

PRIPREMA SERUMA TRETIRANOG UGLJENOM PREMAZANIM DEKSTRANOM (DCC)

1. Tretiranje seruma ugljenom premazanim dekstranom (DCC) opća je metoda za uklanjanje estrogenih spojeva iz seruma koji se dodaje mediju za stanice kako bi se isključio pristrani odgovor povezan s preostalim estrogenom u serumu. Ovim se postupkom može tretirati 500 ml fetalnog goveđeg seruma (FBS).

Sastavnice

2. Bit će potrebni sljedeći materijali i oprema:

Materijali

Aktivni ugljen

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl2 \cdot 6H_2O$)

Saharoza

1 M puferske otopine HEPES (pH 7,4)

Ultračista voda dobivena sustavom za filtriranje

Oprema

Staklena posuda obrađena u autoklavu (veličinu treba prilagoditi po potrebi)
Opća laboratorijska centrifuga (u kojoj se temperatura može postaviti na 4 °C)

Postupak

3. Sljedeći postupak prilagođen je za upotrebu epruveta za centrifugiranje od 50 ml.

[Dan 1.] Pripremiti suspenziju ugljena premazanog dekstranom s 1 l ultračiste vode koja sadržava 1,5 mM MgCl2, 0,25 M saharoze, 2,5 g ugljena, 0,25 g dekstrana i 5 mM HEPES-a te miješati preko noći na 4 °C.

[Dan 2.] Uliti suspenziju u epruvete za centrifugiranje od 50 ml i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Ukloniti supernatant i pohraniti polovinu sedimenta ugljena na temperaturi od 4 °C za upotrebu na dan 3. Suspendirati drugu polovinu ugljena s FBS-om koji je postupno odmrznut kako bi se izbjeglo taloženje i inaktiviran toplinom 30 minuta na 56 °C, a zatim prenijeti u staklenu posudu obrađenu u autoklavu kao što je Erlenmeyerova tikvica. Ovu suspenziju lagano miješati preko noći na temperaturi od 4 °C.

[Dan 3.] Uliti suspenziju s FBS-om u epruvete za centrifugiranje i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Prikupiti FBS i prenijeti ga u novi sediment ugljena pripremljen i pohranjen na dan 2. Suspendirati sediment ugljena i preko noći lagano miješati tu suspenziju na 4 °C u staklenoj posudi obrađenoj u autoklavu.

[Dan 4.] Uliti suspenziju i centrifugirati je deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C te sterilizirati supernatant filtriranjem kroz sterilni filtar od 0,2 μm. Ovaj FBS tretiran DCC-om treba pohraniti na -20 °C i može se upotrijebiti u roku od godinu dana.

▼M8

Dodatak 3.

TEST TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKOG RECEPTORA ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKOG RECEPTORA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE VM7LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom se testu upotrebljava stanična linija VM7Luc4E2 ([1]). Validirali su ga NICEATM (Nacionalni toksikološki program Međuagencijskog centra za evaluaciju alternativnih toksikoloških metoda) i ICCVAM (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda) (1.). Stanične linije VM7Luc uglavnom eksprimiraju endogeni ERα i manju količinu endogenog ERβ (2., 3. i 4.).

2. Ovaj je test primjenjiv na velik raspon tvari pod uvjetom da se one mogu otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO; CAS br. 67-68-5), da ne reagiraju s DMSO-om ili medijem za uzgoj stanične kulture te da nisu citotoksične pri koncentracijama koje se ispituju. Ako nije moguće upotrijebiti DMSO, može se upotrijebiti drugi nosač kao što su etanol ili voda (vidjeti stavak 12.). Dokazana uspješnost testa (ant)agonista VM7Luc ER TA ukazuje na to da podaci koju se dobiju primjenom tog testa mogu dati informacije o mehanizmima djelovanja kojima posreduje estrogenski receptori te bi ga se moglo uzeti u obzir pri utvrđivanju prioriteta tvari za daljnje ispitivanje.

3. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduju hERα i hERß mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Kemiluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima jer daje dovoljno snažan signal u odnosu na pozadinu. Međutim, aktivnost luciferaze krijesnica u testovima na staničnoj osnovi mogu poremetiti tvari koje inhibiraju enzim luciferaze, što uzrokuje i prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju zbog stabilizacije proteina. Osim toga, kod nekih luciferaznih testova reporterskog gena estrogenskog receptora pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μM zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (9) (11). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom.

4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

([1]) Prije lipnja 2016. ta je stanična linija bila određena kao stanična linija BG1Luc. Stanice BG-1 izvorno su opisali Geisinger i dr. (1998.) (12.), a kasnije su ih okarakterizirali istraživači iz NIEHS-a (National Institute of Environmental Health Sciences) (13.). Relativno nedavno otkriveno je da postoje dvije različite varijante stanica BG-1 kojima se istraživači koriste – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Temeljita analiza, uključujući DNK ispitivanje, tih dviju varijanti staničnih linija BG-1 koju su proveli Li i suradnici (2014.) (14.) pokazala je da je BG-1 Fr jedinstven i da BG-1 NIEHS, tj. izvorna stanična linija koja se koristila za razvoj testa, nije stanična linija humanog karcinoma jajnika BG1, već varijanta stanične linije humanog karcinoma dojke MCF7. Stanična linija upotrijebljena u ovom testu, koja se izvorno nazivala BG1Luc4E2 (15.), sada se određuje kao VM7Luc4E2 („V” = varijanta; „M7” = stanice MCF7). Isto tako, test se sada određuje kao VM7Luc ER TA. Iako se time mijenja podrijetlo stanične linije na kojoj se test temelji, ne utječe se na objavljene validacijske studije niti na korisnost i primjenu ovog testa za probir estrogenskih/antiestrogenskih kemikalija.

▼M8

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test se upotrebljava kako bi se označilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda, nakon čega kompleks receptora i liganda translocira u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen (luc), što dovodi do nastanka luciferaze i kasnije emisije svjetla, koja se može kvantificirati s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje. U testu VM7Luc ER TA upotrebljava se stanična linija humanog adenokarcinoma dojke koja reagira na estrogenski receptor, VM7, koja je stabilno transficirana konstruktom reporterskog gena luc krijesnice koji kontroliraju četiri elementa odgovora estrogena postavljena uzlazno od promotora virusa mišjeg tumora dojke (MMTV) kako bi se otkrile tvari s *in vitro* agonističkim ili antagonističkim djelovanjem na estrogenski receptor. Taj promotor MMTV-a pokazuje samo manju unakrsnu reaktivnost s ostalim steroidnim i nesteroidnim hormonima (8.). Kriteriji za tumačenje podataka podrobno su opisani u stavku 41. Ukratko, pozitivni odgovor utvrđuje se na temelju krivulje koncentracija – odgovor, koja sadržava najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost ± standardna devijacija) te promjene amplitude (normalizirana relativna jedinica svjetlosti (RLU)) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu (17β-estradiol [E2; CAS br. 50-28-2] za test agonista, raloksifen HCl [Ral; CAS br. 84449-90-1]/E2 za test antagonista).

POSTUPAK

Stanična linija

6. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija VM7Luc4E2. Stanična linija trenutačno je dostupna samo sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju s ustanovom University of California, Davis, Kalifornija, SAD ([1]) i društvom Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Sjeverna Karolina, SAD ([2]).

Stabilnost stanične linije

7. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanične linije, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u mediju za održavanje stanica (vidjeti stavak 9.). Stanice se ne bi trebale uzgajati za više od 30 pasaža. Za staničnu liniju VM7Luc4E2 30 pasaža trajat će približno tri mjeseca.

Stanična kultura i uvjeti nasađivanja

8. Treba poštovati postupke utvrđene u Smjernicama za dobru praksu za stanične kulture (5. i 6.) kako bi se osigurala kvaliteta svih materijala i metoda te tako održali integritet, valjanost i obnovljivost svih provedenih aktivnosti.

9. Stanice VM7Luc4E2 održavaju se u mediju RPMI 1640 obogaćenom s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina i 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) u namjenskom inkubatoru kulture tkiva na 37 ^{o}C ± 1 ^{o}C, vlažnosti od 90 % ± 5 % i s 5,0 % ± 1 % CO_2 u zraku.

10. Kada se dosegne konfluencija od ~ 80 %, uzgaja se supkultura stanica VM7Luc4E2 koje se kondicioniraju na okolinu bez estrogena 48 sati prije nasađivanja na ploče s 96 jažica radi izlaganja ispitivanim kemikalijama i analize indukcije aktivnosti luciferaze koja ovisi o estrogenu. Medij bez

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-pošta: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 SAD, e-pošta: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, faks: 919-688-4404.

▼M8

estrogena (EFM) sadržava Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljenom premazanim dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti [vidjeti podrobni protokol (7.)].

Kriteriji prihvatljivosti

11. Prihvaćenje ili odbijanje ispitivanja temelji se na procjeni rezultata referentne norme i kontrole iz svakog pokusa provedenog na pločici s 96 jažica. Svaka referentna norma ispituje se s više koncentracija i koristi se više uzoraka svake referentne i kontrolne koncentracije. Rezultati se uspoređuju s kontrolama kvalitete (KK) u pogledu tih parametara koji su izvedeni iz baza prijašnjih podataka o agonistima i antagonistima koje je izradio svaki laboratorij tijekom dokazivanja osposobljenosti. Baze prijašnjih podataka kontinuirano se dopunjuju vrijednostima referentnih normi i kontrola. Promjene u opremi ili laboratorijskim uvjetima možda će zahtijevati ažuriranje baza prijašnjih podataka.

Test agonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Indukcija: indukciju na ploči treba mjeriti tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruka indukcija, ali u svrhu prihvaćanja indukcija bi trebala biti četverostruka ili veća.

- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s otapalom trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.

- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,

- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s metoksiklorom trebale bi biti veće od srednje vrijednosti DMSO-a uvećane za tri standardne devijacije srednje vrijednosti DMSO-a,

- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Test antagonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Smanjenje: smanjenje na ploči mjeri se tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruko smanjenje, ali u svrhu prihvaćanja smanjenje bi trebalo biti trostruko ili veće.

- Rezultati kontrole s E2: vrijednosti RLU kontrole s E2 trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s E2.

▼M8

- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.

- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme Ral/E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,

- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s tamoksifenom/E2 trebale bi biti manje od srednje vrijednosti kontrole s E2 umanjene za tri standardne devijacije srednje vrijednosti kontrole s E2,

- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Referentne norme, pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

Kontrola s nosačem (testovi agonista i antagonista)

12. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s nosačem. Nosač koji se koristio tijekom validacije testa VM7Luc ER TA bio je 1-postotni (v/v) dimetilsulfoksid (DMSO, CAS br. 67-68-5) (vidjeti stavak 24.). Ako se upotrebljava nosač koji nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba prema potrebi ispitati u istom nosaču.

Referentna norma (utvrđivanje raspona agonista)

13. Referentnu normu čini E2 (CAS br. 50-28-2). Za ispitivanje za utvrđivanje raspona referentna norma sastoji se od serijskog razrjeđivanja četiriju koncentracija E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} i 2,87 x 10^{-12} M), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje agonista)

14. E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja u omjeru 1: 2 koje se sastoji od 11 koncentracija (u rasponu od 3,67 x 10^{-10} do 3,59 x 10^{-13} M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (utvrđivanje raspona antagonista)

15. Referentna norma kombinacija je tvari Ral (CAS br. 84449-90-1) i E2 (CAS br. 50-28-2). Ral/E2 za ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskog razrjeđivanja triju koncentracija tvari Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} i 1,92 x 10^{-10} M) i fiksne koncentracije (9,18 × 10^{-11} M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje antagonista)

16. Ral/E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja tvari Ral u omjeru 1: 2 (u rasponu od 2,45 x 10^{-8} do 9,57 x 10^{-11} M) i fiksne koncentracije (9,18 × 10^{-11} M) E2, a obuhvaća devet koncentracija tvari Ral/E2 u dvostrukim jažicama.

Slaba pozitivna kontrola (agonist)

17. Slabu pozitivnu kontrolu čini 9,06 x 10^{-6} M p,p'-metoksiklora (metoksiklor; CAS br. 72-43-5) u EFM-u.

▼M8

Slaba pozitivna kontrola (antagonist)

18. Slaba pozitivna kontrola sastoji se od tamoksifena (CAS br. 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M s 9,18 × 10^{-11} M E2 u EFM-u.

Kontrola s E2 (samo za test antagonista)

19. Kontrolu s E2 čini 9,18 × 10^{-11} M E2 u EFM-u i koristi se kao osnovna negativna kontrola.

Multiplikacijski faktor indukcije (agonist)

20. Indukcija aktivnosti luciferaze referentne norme (E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i rezultat bi trebao biti veći od četverostruke vrijednosti.

Multiplikacijski faktor smanjenja (antagonist)

21. Srednja aktivnost luciferaze za referentnu normu (Ral/E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i trebala bi biti veća od trostruke vrijednosti.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

22. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa tu ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječe na uspješnost testa. Referentne norme i kontrole otapaju se u 100-postotnom otapalu i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u.

Priprema ispitivanih kemikalija

23. Ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili odgovarajućem otapalu) i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u. Sve ispitivane kemikalije trebalo bi ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom prije nego što ih se otopi i razrijedi. Za svaki pokus treba pripremiti svježe otopine ispitivane kemikalije. U otopinama ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno; međutim, za svaki pokus treba pripremiti svježu konačnu referentnu normu, razrjeđivanja kontrole i ispitivane kemikalije i treba ih upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

24. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskih razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1: 10 i provodi se dvaput. Ispitivane kemikalije prvo se ispituju do najveće koncentracije od 1 mg/ml (~ 1 mM) za test agonista i 20 μg/ml (~ 10 μM) za test antagonista. Pokusi za utvrđivanje raspona provode se kako bi se utvrdilo sljedeće:

— početne koncentracije ispitivane kemikalije koje će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja,

— razrjeđivanja ispitivane kemikalije (1: 2 ili 1: 5) koja će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja.

▼M8

25. U protokole za test agonista i antagonista uključena je procjena vijabilnosti stanica/citotoksičnosti (7.) te se ona uključuje u test za utvrđivanje raspona i iscrpno ispitivanje. Metoda citotoksičnosti upotrijebljena za procjenu vijabilnosti stanica tijekom validacije testa VM7Luc ER TA (1.) bila je metoda razmjernog kvalitativnog vizualnog opažanja; međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti može se upotrijebiti kvantitativna metoda (vidjeti protokol (7.)). Ne mogu se upotrebljavati podaci iz koncentracija ispitivane kemikalije koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti veće od 20 %.

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Stanice se broje i nasađuju na ploče s kulturom tkiva s 96 jažica (2×10^5 stanica po jažici) u EFM-u i inkubiraju se 24 sata kako bi se omogućilo da se stanice pričvrste na ploču. EFM se uklanja i zamjenjuje ispitivanim i referentnim kemikalijama u EFM-u te se inkubira 19–24 sata. Posebnu pozornost treba posvetiti tvarima koje su jako hlapljive jer kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate. U tim slučajevima mogu pomoći „poklopci za ploče” kojima se učinkovito izoliraju pojedinačne jažice pa se stoga preporučuje njihova upotreba.

Ispitivanja za utvrđivanje raspona

27. U ispitivanjima za utvrđivanje raspona upotrebljavaju se sve jažice ploče s 96 jažica kako bi se dvaput ispitalo do šest ispitivanih kemikalija kao serijska razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1: 10 (vidjeti slike 1. i 2.).

— U ispitivanju za utvrđivanje raspona agonista upotrebljavaju se četiri koncentracije E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om.

— U ispitivanju za utvrđivanje raspona antagonista upotrebljavaju se tri koncentracije tvari Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i tri jažice s ponavljanjem za kontrole s E2 i DMSO-om.

Slika 1.

Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Kratice: E2-1 do E2-4 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO (1 % v/v EFM-a)).

▼M8

Slika 2.

Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-3 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: Sve ispitivane kemikalije ispituju se s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 200 µl. Trebaju se upotrebljavati samo ispitne ploče kod kojih vijabilnost stanica u svim jažicama iznosi 80 % ili više.

29. Utvrđivanje početne koncentracije za iscrpno ispitivanje ***agonista*** podrobno je opisano u protokolu za agoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

— ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1: 2, počevši od najviše topljive koncentracije,

— ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedan log viša od koncentracije koja je dala najvišu prilagođenu vrijednost RLU u ispitivanju za utvrđivanje raspona. Plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na omjeru 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1: 5,

▼M8

— ako ispitivana kemikalija u ispitivanju za utvrđivanje raspona pokaže dvofazičnu krivulju koncentracija – odgovor, obje faze treba utvrditi i u iscrpnom ispitivanju.

30. Utvrđivanje početnih koncentracija za iscrpno ispitivanje ***antagonista*** podrobno je opisano u protokolu za antagoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

— ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su manje od srednje vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole E2, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1: 2, počevši od najviše topljive koncentracije,

— ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su manje od prosječne vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole s E2, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedna od sljedećih opcija:

• koncentracija koja daje najmanju prilagođenu vrijednost RLU u testu za utvrđivanje raspona,

• najviša topljiva koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-2.),

• najniža citotoksična koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-3. za povezani primjer),

— plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na serijskom razrjeđivanju u omjeru 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1: 5.

Iscrpno ispitivanje

31. Iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskih razrjeđivanja od 11 točaka (serijska razrjeđivanja u omjeru 1: 2 ili 1: 5 na temelju početne koncentracije za kriterije iscrpnih testova), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u trostrukim jažicama ploče s 96 jažica (vidjeti slike 3. i 4.).

— U iscrpnom ispitivanju agonista kao referentna norma upotrebljava se 11 koncentracija E2 u dva ponavljanja. Svaka ploča uključuje četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s metoksiklorom ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— U iscrpnom ispitivanju antagonista kao referentna norma upotrebljava se devet koncentracija tvari Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja, s četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za tamoksifen $3{,}36 \times 10^{-6}$ M.

▼M8

Slika 3.

Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Kratice: TC1-1 do TC1-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 1 (od visoke do niske); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 2 (od visoke do niske); E2-1 do E2-11 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); Meth = slaba pozitivna kontrola p,p' metoksiklor; VC = kontrola s nosačem DMSO (1 % v/v) u EFM-u.

Slika 4.

Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-9 = koncentracije raloksifena/ referentne norme E2 (od visoke do niske); Tam = slaba pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: kako je navedeno, sve referentne i ispitivane jažice sadržavaju fiksnu koncentraciju E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

32. Ponavljanja iscrpnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost. Treba provesti barem dva iscrpna ispitivanja. Ako su rezultati testova kontradiktorni (npr. jedan je test pozitivan, a drugi negativan) ili ako jedan od testova nije primjeren, treba provesti treći dodatni test.

Mjera luminiscencije

33. Luminiscencija se mjeri u rasponu od 300 do 650 nm, upotrebom ubrizgavajućeg luminometra sa softverom koji kontrolira volumen ubrizgavanja i interval mjerenja (7.). Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao RLU po jažici.

▼M8

ANALIZA PODATAKA

Utvrđivanje vrijednosti EC_{50}/IC_{50}

34. Vrijednost EC_{50} (pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije [agonisti]) i vrijednost IC_{50} (pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane kemikalije [antagonisti]) utvrđuju se na temelju podataka o koncentraciji i odgovoru. Za ispitivane kemikalije koje su pozitivne pri jednoj koncentraciji ili njih više, koncentracija ispitivane kemikalije koja uzrokuje pola najvećeg odgovora (IC_{50} ili EC_{50}) računa se upotrebom analize Hillove funkcije ili primjerene alternative. Hillova funkcija logistički je matematički model s četiri parametra kojim se povezuju koncentracija ispitivane kemikalije i odgovor (obično u obliku sigmoidne krivulje) primjenom sljedeće jednadžbe:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hillov\ nagib}$$

pri čemu je:

X = logaritam koncentracije

Y = odgovor (tj. RLU-ovi)

dno = najmanji odgovor

vrh = najveći odgovor

lg EC_{50} (ili lg IC_{50}) = logaritam od X kao odgovor koji se nalazi točno između vrha i dna

Hillov nagib = kosina krivulje.

Modelom se računa najbolja vrijednost za parametre vrha, dna, Hillova nagiba te vrijednosti IC_{50} i EC_{50}. Za izračun vrijednosti EC_{50} i IC_{50} treba upotrijebiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad PrismR).

Utvrđivanje netipičnih vrijednosti

35. Dobro statističko prosuđivanje moglo bi se olakšati uključivanjem (ali ne i isključivo) Q testa (vidjeti protokole za agoniste i antagoniste (7.) o utvrđivanju „neupotrebljivih" jažica koje će se isključiti iz analiza podataka).

36. Za ponovljene uzorke referentne norme E2 (dva uzorka) bilo koja prilagođena vrijednost RLU za ponovljeni uzorak pri određenoj koncentraciji E2 smatra se netipičnom vrijednosti ako je za više od 20 % veća ili manja od prilagođene vrijednosti RLU te koncentracije iz baze prijašnjih podataka.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za ispitivanje za utvrđivanje raspona

37. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Trebalo bi provesti sljedeće izračune.

Agonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

▼**M8**

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC_{50} za ispitivane kemikalije.

Antagonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor smanjenja za referentnu normu (Ral/E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost IC_{50} za ispitivane kemikalije.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za iscrpna ispitivanja

38. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Provode se sljedeći izračuni:

Agonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC_{50} za E2 i ispitivane kemikalije.

Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za metoksiklor.

Antagonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (Ral/E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost IC_{50} za Ral/E2 i ispitivane kemikalije.

Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za tamoksifen.

Korak 6. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

▼M8

Kriteriji za tumačenje podataka

39. Test VM7Luc ER TA dio je pristupa snage dokaza kako bi se pomoglo utvrditi prioritetne tvari za *in vivo* ispitivanje endokrine disrupcije. Dio ovog postupka za utvrđivanje prioriteta bit će razvrstavanje ispitivane kemikalije kao pozitivne ili negativne u pogledu agonističkog ili antagonističkog djelovanja na estrogenski receptor. Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke koji su upotrijebljeni u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA opisani su u tablici 1.

Tablica 1.

Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke

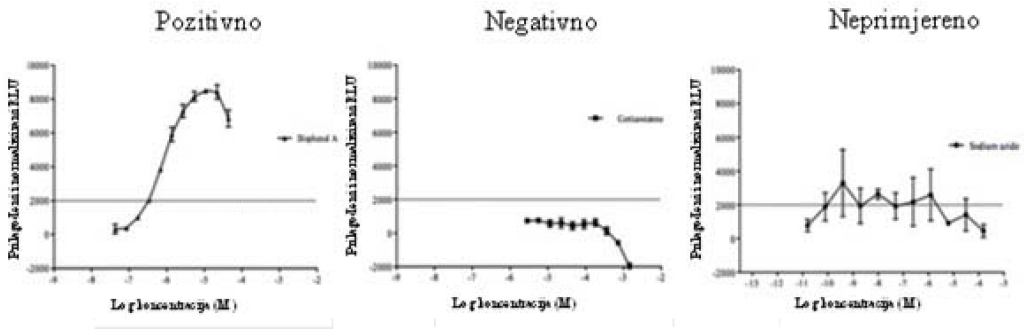
AGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	— Sve ispitivane kemikalije razvrstane kao *pozitivne na* agonističko djelovanje na estrogenski receptor trebaju imati krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi pozitivan nagib i završava platoom ili najvišom točkom. U nekim se slučajevima mogu utvrditi samo dva svojstva (osnovica – nagib ili nagib – najviša točka). — Linija koja označava pozitivan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost ± standardna devijacija). Isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati najvišu točku ili prvu točku platoa. — Za razvrstavanje kemikalije kao pozitivne potrebna je amplituda odgovora (razlika između osnovice i najviše točke) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, E2 (tj. 2 000 RLU-ova ili više ako je najveća vrijednost odgovora referentnih normi [E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). — Ako je moguće, treba izračunati vrijednost EC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Prosječni prilagođeni RLU za određenu koncentraciju jednak je ili manji od srednje vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om uvećane za tri standardne devijacije RLU-a DMSO-a.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikalije treba ponovno ispitati.
ANTAGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	— Podaci o ispitivanoj kemikaliji daju krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi negativan nagib. — Linija koja označava negativan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju; isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati prvu točku platoa. — Trebalo bi postojati smanjenje aktivnosti od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, tvar Ral/E2 (tj. 8 000 RLU-ova ili manje ako je najveća vrijednost odgovora referentne norme [Ral/E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). — Najviše koncentracije ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične trebale bi biti 1×10^{-5} M ili niže. — Ako je moguće, treba izračunati vrijednost IC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Sve podatkovne točke iznad su vrijednosti EC_{80} (80 % odgovora E2 ili 8 000 RLU-ova), pri koncentracijama nižima od $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikaliju treba ponovno ispitati.

▼M8

40. Ako je moguće, pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Primjeri pozitivnih, negativnih i neprimjerenih podataka prikazani su na slikama 5. i 6.

Slika 5.

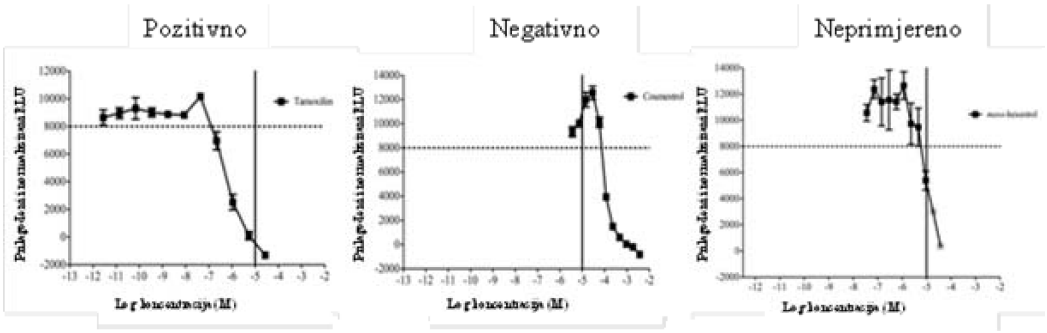
Primjeri agonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 20 % odgovora E2, 2 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Slika 6.

Primjeri antagonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 80 % odgovora Ral/E2, 8 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Puna linija pokazuje $1{,}00 \times 10^{-5}$ M. Da bi se odgovor smatrao pozitivnim, treba se nalaziti ispod linije 8 000 RLU-ova i pri koncentracijama nižima od $1{,}00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentracije označene zvjezdicama na grafikonu mezo-heksestrola pokazuju rezultate vijabilnosti od „2” ili veće.

Rezultati ispitivanja za mezo-heksestrol smatraju se neprimjerenim podacima jer se do jedinog odgovora koji se nalazi ispod 8 000 RLU-ova dolazi pri $1{,}00 \times 10^{-5}$ M.

41. Vrijednosti EC_{50} i IC_{50} mogu se izračunati primjenom Hillove funkcije s četiri parametra (više pojedinosti potražiti u protokolima za agoniste i antagoniste (7.)). Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci (vidjeti stavak 19. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”).

▼**M8**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

42. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

2. Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467.–479.

3. Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367.–5373.

4. Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936.–5941.

5. Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): str. 270.–273.

6. Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: str. 261.–287.

7. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

8. Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. Toxicol.,13(1):67.–82.

9. Escande A., *et al*. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1459.–69.

10. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646.–57.

11. Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4252.–63.

12. Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280.–288.

13. Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649.–654.

14. Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072.–2081.

15. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67.–82.

▼**M8**

Dodatak 4.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA KEMIKALIJA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE ERA CALUX

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U testu transaktivacije ERα CALUX upotrebljava se humana stanična linija U2OS radi otkrivanja estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα). Validacijska studija biotesta sa stabilno transficiranim stanicama ERα CALUX koju je proveo BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.). Stanična linija ERα CALUX eksprimira samo stabilno transficirani humani ERα (2. i 3.).

2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hERα mjerenjem bioluminiscencije kao krajnje točke. Bioluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima zbog visokog omjera signala i šuma (4.).

3. Postoje izvješća o tome da koncentracije fitoestrogena veće od 1 μM pretjerano aktiviraju reporterski gen za luciferazu, što dovodi do luminiscencije kojom ne posreduju receptori (5., 6. i 7.). Stoga veće koncentracije fitoestrogena ili drugih sličnih spojeva koji mogu pretjerano aktivirati ekspresiju luciferaze treba pažljivo ispitati testovima transaktivacije stabilno transficiranog estrogenskog receptora (vidjeti Dodatak 2.).

4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Biotest se upotrebljava kako bi se procijenilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda te kasnija translokacija kompleksa receptora i liganda u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu krijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Nakon dodavanja supstrata luciferaze luciferinu, luciferin se pretvara u bioluminescentan proizvod. Proizvedeno svjetlo može se jednostavno uočiti i kvantificirati s pomoću luminometra.

6. U ispitnom sustavu upotrebljavaju se stabilno transficirane stanice ERα CALUX. Stanice ERα CALUX potječu od stanične linije U2OS humanog osteoblastičnog osteosarkoma. Humane stanice U2OS stabilno su transficirane konstruktima 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-neo-hERα upotrebom metode zajedničkog taloženja s kalcijevim fosfatom. Stanična linija U2OS odabrana je kao najbolji kandidat za reportersku staničnu liniju koja reagira na estrogen (i ostale steroidne hormone) na temelju opažanja da stanična linija U2OS pokazuje slabu endogenu aktivnost receptora ili je uopće ne pokazuje. Odsustvo endogenih receptora procijenjeno je upotrebom samo reporterskih plazmida za luciferazu, koji nisu pokazali nikakvu aktivnost kada su dodani ligandi na receptor. Nadalje, ta je stanična linija dala snažne odgovore posredovane hormonima kada su privremeno uvedeni srodni receptori (2., 3. i 8.).

7. Ispitivanje kemikalija radi utvrđivanja estrogene ili antiestrogene aktivnosti upotrebom stanične linije ERα CALUX uključuje ciklus predprobira i iscrpne cikluse. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuju se topljivost, citotoksičnost i rafinirani raspon koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpno

▼M8

ispitivanje. Tijekom iscrpnih ciklusa rafinirani rasponi koncentracija ispitivanih kemikalija ispituju se biotestovima ERα CALUX, nakon čega slijedi razvrstavanje ispitivanih kemikalija u pogledu agonizma ili antagonizma.

8. Kriteriji za tumačenje podataka podrobno su opisani u stavku 59. Ukratko, ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za agonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokažu odgovor koji iznosi 10 % najvećeg odgovora referentne norme 17β-estradiol ili više (PC_{10}). Ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za antagonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokažu odgovor koji iznosi 80 % najvećeg odgovora referentne norme tamoksifena ili manje (PC_{80}).

POSTUPAK

Stanične linije

9. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija U2OS ERα CALUX. Stanična linija može se dobiti od društva BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska, sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju.

10. Treba upotrebljavati samo stanične kulture u kojima nema mikoplazme. Šarže stanica koje se upotrebljavaju trebaju imati potvrdu da nisu kontaminirane mikoplazmom ili prije upotrebe treba provesti test na mikoplazmu. Za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom treba upotrijebiti RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) (9.).

Stabilnost stanične linije

11. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanica CALUX, stanice treba pohraniti u tekućem dušiku (–80 °C). Nakon odmrzavanja stanica kako bi se razvila nova kultura, stanice treba supkultivirati barem dva puta prije nego što ih se upotrijebi za procjenu estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kemikalija. Stanice se ne bi se trebale supkultivirati za više od 30 pasaža.

12. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije tijekom vremena, treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava za agonizam i antagonizam procjenom vrijednosti EC_{50} ili IC_{50} referentne norme. Osim toga, treba pratiti relativnu indukciju pozitivnog kontrolnog uzorka (PC) i negativnog kontrolnog uzorka (NC). Rezultati bi trebali biti u skladu s kriterijima prihvatljivosti za agonistički (tablica 3.C) ili antagonistički biotest ERα CALUX (tablica 4.C). Referentne norme, pozitivne i negativne kontrole navedene su u tablici 1. za agonistički oblik i tablici 2. za antagonistički oblik.

Stanična kultura i uvjeti nasađivanja

13. Stanice U2OS treba uzgajati u mediju za uzgoj (medij DMEM/F12 (1: 1) s fenol crvenom kao indikatorom pH-vrijednosti, obogaćenom fetalnim goveđim serumom (7,5 %), neesencijalnim aminokiselinama (1 %), s 10 jedinica/ml penicilina, streptomicina i geneticina (G-418) kao markerom za selekciju). Stanice treba staviti u inkubator CO_2 (5 % CO_2) na 37 °C uz 100-postotnu vlažnost. Kada stanice dosegnu konfluenciju od 85 do 95 %, treba ih supkultivirati ili pripremiti za nasađivanje na mikrotitracijske ploče s 96 jažica. U potonjem slučaju, stanice treba ponovno suspendirati u koncentraciji 1×10^5 stanica/ml u mediju za test bez estrogena (DMEM/F12 (1: 1) bez fenol crvene, obogaćenom fetalnim goveđim serumom tretiranim ugljenom premazanim dekstranom (5 % v/v), neesencijalnim aminokiselinama (1 % v/v), s 10 jedinica/ml penicilina i streptomicina) te nasaditi u jažice mikrotitracijskih ploča s 96 jažica (100 µl homogenizirane suspenzije stanica). Stanice treba predinkubirati u inkubatoru CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100-postotna vlažnost) 24 sata prije izlaganja. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogena.

▼M8

Kriteriji prihvatljivosti

14. Agonističko i antagonističko djelovanje ispitivanih kemikalija ispituju se u nizovima ispitivanja. Niz ispitivanja sastoji se od najviše šest mikrotitracijskih ploča. Svaki niz ispitivanja sadržava najmanje jednu cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme, pozitivan kontrolni uzorak, negativan kontrolni uzorak i kontrole s otapalom. Na slikama 1. i 2. prikazan je raspored ploča za nizove ispitivanja agonizma i antagonizma.

15. Svako razrjeđivanje referentnih normi, ispitivane kemikalije, sve kontrole s otapalom te pozitivne i negativne kontrole treba analizirati u tri ponavljanja. Svaka analiza triju ponavljanja treba ispuniti zahtjeve navedene u tablici 3.A i tablici 4.A.

16. Cijela serija razrjeđivanja referentne norme (17β-estradiol za agonizam; tamoksifen za antagonizam) mjeri se na prvoj ploči u svakom nizu ispitivanja. Kako bi se rezultati analize preostalih pet mikrotitracijskih ploča mogli usporediti s prvom mikrotitracijskom pločom koja sadržava cijelu krivulju koncentracija – odgovor referentne norme, sve bi ploče trebale sadržavati tri kontrolna uzorka: kontrolu s otapalom, najvišu koncentraciju ispitane referentne norme i približnu koncentraciju EC_{50} (agonizam) ili IC_{50} (antagonizam) referentne norme. Omjer prosječnih kontrolnih uzoraka na prvoj ploči i preostalih pet ploča treba ispunjavati zahtjeve navedene u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).

17. Za sve mikrotitracijske ploče u nizu ispitivanja računa se z-faktor (10.). Z-faktor treba izračunati upotrebom odgovora pri najvišoj i najnižoj koncentraciji referentne norme. Mikrotitracijska ploča smatra se valjanom ako ispunjava zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).

18. Referentna norma treba pokazati sigmoidnu krivulju doza – odgovor. EC_{50} ili IC_{50} izvedeni iz odgovora serije razrjeđivanja referentne norme trebaju ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).

19. Svaki niz ispitivanja treba sadržavati pozitivni i negativni kontrolni uzorak. Izračunana relativna indukcija i pozitivnog i negativnog kontrolnog uzorka treba ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).

20. Tijekom svih mjerenja faktor indukcije najviše koncentracije referentne norme treba izmjeriti tako da se prosječni najviši odgovor u obliku relativne jedinice svjetlosti (RLU) na referentnu normu 17β-estradiol podijeli prosječnim odgovorom u obliku RLU-a na referentnu kontrolu s otapalom. Taj faktor indukcije treba ispuniti minimalne zahtjeve za multiplikacijski faktor indukcije kako je navedeno u tablici 3.C (agonizam) ili tablice 4.C (antagonizam).

21. Valjanima se smatraju samo mikrotitracijske ploče koje ispunjavaju sve prethodno navedene kriterije prihvatljivosti i samo se one mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija.

22. Kriteriji prihvatljivosti primjenjivi su i na predprobir i na iscrpne cikluse.

▼M8

Tablica 1.

Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za agonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	17β-estradiol	50-28-2	$1 * 10^{-13} – 1 * 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3 * 10^{-6}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1 * 10^{-8}$

Tablica 2.

Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za antagonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	tamoksifen	10540-29-1	$3 * 10^{-9} – 1 * 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1 * 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1 * 10^{-5}$

Tablica 3.

Kriteriji prihvatljivosti za agonistički biotest ERα CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči		**Kriterij**
1	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, osim C0)	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za kontrole s otapalom referentne norme i ispitivane kemikalije (C0, SC))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracijske ploče		
4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,5 do 2,0
5	Omjer približ. vrijednosti EC_{50} i najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti EC_{50} i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4, C8)	0,70 do 1,30
6	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
7	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (17ß-estradiol)
8	Raspon EC_{50} referentne norme 17ß-estradiol	$4 * 10^{-12} – 4 * 10^{-11}$ M
9	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije najviše koncentracije 17ß-estradiola, s obzirom na kontrolu s otapalom referentne norme	5
10	Relativna indukcija (%) PC-a	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) NC-a	< 10 %

▼M8

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Tablica 4.

Kriteriji prihvatljivosti za antagonistički biotest ERα CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči		**Kriterij**
1	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, kontrolu s otapalom (C0))	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za kontrolu s nosačem (VC) i najvišu koncentraciju referentne norme (C8))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracijske ploče		
4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,70 do 1,30
5	Omjer približ. vrijednosti IC_{50} koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti IC_{50} koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4)	0,70 do 1,30
6	Omjer najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C8)	0,50 do 2,0
7	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
8	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (tamoksifen)
9	Raspon IC_{50} referentne norme (tamoksifen)	$1 * 10^{-8} – 1 * 10^{-7}$ M
10	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije kontrole s otapalom referentne norme, s obzirom na najvišu koncentraciju tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) PC-a	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) NC-a	> 85 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista); SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole

23. I za ciklus predprobira i za iscrpne cikluse treba upotrebljavati istu kontrolu s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne i negativne kontrole. Osim toga, koncentracija referentnih normi, pozitivnih i negativnih kontrola treba biti ista.

▼**M8**

Kontrola s otapalom

24. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s otapalom. Tijekom validacije biotesta ERα CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču. Potrebno je napomenuti da kontrola s otapalom za antagonističke studije sadržava fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC_{50}). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava u antagonističkim studijama, treba pripremiti i ispitati kontrolu s nosačem.

Kontrola s nosačem (antagonizam)

25. Kod ispitivanja antagonizma medij za test obogaćuje se fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC_{50}). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija za antagonizam, treba pripremiti medij za test bez fiksne koncentracije 17β-estradiola – referentne norme agonista. Taj se kontrolni uzorak označava kao kontrola s nosačem. Tijekom validacije biotesta ERα CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču.

Referentne norme

26. Referentnu normu agonista čini 17β-estradiol (tablica 1.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija 17β-estradiola ($1 * 10^{-13}$, $3 * 10^{-13}$, $1 * 10^{-12}$, $3 * 10^{-12}$, $6 * 10^{-12}$, $1 * 10^{-11}$, $3 * 10^{-11}$, $1 * 10^{-10}$ M).

27. Referentnu normu antagonista čini tamoksifen (tablica 2.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija tamoksifena ($3 * 10^{-9}$, $1 * 10^{-8}$, $3 * 10^{-8}$, $1 * 10^{-7}$, $3 * 10^{-7}$, $1 * 10^{-6}$, $3 * 10^{-6}$, $1 * 10^{-5}$ M). Svaka koncentracija referentne norme antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista ($3 * 10^{-12}$ M).

Pozitivna kontrola

28. Pozitivnu kontrolu za agonističke studije čini 17α-metiltestosteron (tablica 1.).

29. Pozitivnu kontrolu za antagonističke studije čini 4-hidroksitamoksifen (tablica 2.). Pozitivna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista ($3 * 10^{-12}$ M).

Negativna kontrola

30. Negativnu kontrolu za agonističke studije čini kortikosteron (tablica 1.).

31. Negativnu kontrolu za antagonističke studije čini resveratrol (tablica 2.). Negativna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista ($3 * 10^{-12}$ M).

▼M8

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

32. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba potpuno otopiti ispitivanu kemikaliju i mora se moći miješati s medijem za stanice. Primjerena su otapala DMSO, voda i etanol (čistoće od 95 % do 100 %). Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, najviša koncentracija DMSO-a tijekom inkubacije ne treba biti veća od 1 % (v/v). Otapalo prije upotrebe treba ispitati kako bi se utvrdilo da nije citotoksično i da ne utječe na uspješnost testa.

Priprema referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija

33. Referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole i ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili primjerenom otapalu). U istom otapalu zatim treba pripremiti i primjerena (serijska) razrjeđivanja. Prije otapanja sve tvari treba ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom. U svježe pripremljenim glavnim otopinama referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno. Prije svakog pokusa treba pripremiti glavne otopine ispitivanih kemikalija. Za svaki pokus treba pripremiti svježa konačna razrjeđivanja referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija te ih treba upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost, citotoksičnost i utvrđivanje raspona

34. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuje se topljivost ispitivanih kemikalija u odabranom otapalu. Priprema se najviša koncentracija glavne otopine od 0,1 M. Ako se pri toj koncentraciji pojave poteškoće s topljivosti, treba pripremiti glavne otopine niže koncentracije dok se ispitivane kemikalije potpuno ne otope. Tijekom ciklusa predprobira ispituju se serijska razrjeđivanja ispitivane kemikalije u omjeru 1: 10. Najveća koncentracija u testu za ispitivanje agonista i antagonista iznosi 1 mM. Nakon predprobira izvodi se primjereni rafinirani raspon koncentracija za ispitivane kemikalije koji treba ispitati tijekom iscrpnih ciklusa. U iscrpnom ispitivanju trebaju se ispitati razrjeđivanja od 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x i 3000x.

35. Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je u protokol za test agonista i antagonista (11.). Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je i u ciklus predprobira i u iscrpne cikluse. Metoda upotrijebljena za procjenu citotoksičnosti tijekom validacije biotesta ERα CALUX bio je test propuštanja laktat dehidrogenaze (LDH) u kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom stanica (vidjeti Dodatak 4.1.) nakon izlaganja ispitivanim kemikalijama. Međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti mogu se upotrijebiti druge kvantitativne metode (npr. kolorimetrijski test na temelju tetrazolija (MTT) ili biotest citotoksičnosti CALUX). Općenito, koncentracije ispitivane kemikalije koje pokažu smanjenje vijabilnosti stanica veće od 20 % smatraju se citotoksičnima i stoga se ne mogu upotrijebiti za procjenu podataka. Kad je riječ o testu propuštanja LDH-a, koncentracija ispitivane kemikalije smatra se citotoksičnom ako je postotak propuštanja LDH-a veći od 120 %.

▼M8

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

36. Nakon tripsinizacije konfluentne tikvice uzgojenih stanica, stanice se ponovno suspendiraju pri koncentraciji od 1 x 105 stanica/ml u mediju za test bez estrogena. Sto µl stanica koje su ponovno suspendirane nasađuju se u unutarnje jažice mikrotitracijske ploče s 96 jažica. Vanjske jažice pune se s 200 µl fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) (vidjeti slike 1. i 2.). Nasađene stanice predinkubiraju se 24 sata u inkubatoru CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

37. Nakon predinkubacije ploče se pregledavaju kako bi se vizualno utvrdile citotoksičnost (vidjeti Dodatak 4.1.), kontaminacija i konfluencija. Za ispitivanje se koriste samo ploče na kojima nema vizualnih znakova citotoksičnosti, kontaminacije i kod kojih konfluencija iznosi najmanje 85 %. Medij iz unutarnjih jažica pažljivo se uklanja i zamjenjuje s 200 µl medija za test bez estrogena koji sadržava primjerene serije razrjeđivanja referentnih normi, ispitivanih kemikalija, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i kontrola s otapalom (tablica 5.: studije agonista; tablica 6.: studije antagonista). Sve referentne norme, ispitivane kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole i kontrole s otapalom ispituju se u tri ponavljanja. Na slici 1. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje agonista. Na slici 2. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje antagonista. Raspored na ploči za predprobir isti je kao i za iscrpno ispitivanje. Kod ispitivanja antagonista sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3 * 10^{-12}$ M). Treba napomenuti da referentne norme C8 i C4 treba dodati svakoj ploči s ispitivanom kemikalijom.

38. Nakon izlaganja stanica svim kemikalijama, mikrotitracijske ploče s 96 jažica treba inkubirati još 24 sata u inkubatoru CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

Slika 1.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za predprobir i procjenu agonističkog učinka

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

▼M8

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 µl PBS-a.

Slika 2.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za antagonistički predprobir i procjenu antagonističkog učinka

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

VC = kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista – 17β-estradiola).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 µl PBS-a.

Napomena: sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3{,}0 * 10^{-12}$ M).

Mjerenje luminiscencije

39. Mjerenje luminiscencije podrobno je opisano u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Medij treba ukloniti iz jažica i stanice treba lizirati nakon 24 sata inkubacije kako bi se otvorila stanična membrana i omogućilo mjerenje aktivnosti luciferaze.

▼M8

40. Kod mjerenja luminiscencije za taj je postupak potreban luminometar s dva ubrizgavača. Reakcija luciferaze pokreće se ubrizgavanjem supstrata luciferina. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 0,2 M NaOH. Reakcija se zaustavlja kako bi se spriječilo prenošenje luminiscencije iz jedne jažice u drugu.

41. Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao relativna jedinica svjetlosti (RLU) po jažici.

Ciklus predprobira

42. Rezultati analize predprobira upotrebljavaju se za utvrđivanje rafiniranog raspona koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpna ispitivanja. Procjena rezultata analize predprobira i utvrđivanja rafiniranog raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za iscrpno ispitivanje podrobno je opisana u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Ovdje je naveden kratak sažetak postupaka za utvrđivanje raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za ispitivanje agonista i antagonista. Smjernice o dizajnu serijskog razrjeđivanja potražiti u tablicama 5. i 6.

Odabir koncentracija za procjenu agonističkih učinaka

43. Tijekom ciklusa predprobira ispitivane kemikalije treba ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).

44. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 3.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

45. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:

— ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,

— ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću indukciju. Ciklus predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.

46. Kada se opazi valjani odgovor na dozu, treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se opazi najveća indukcija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.

47. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 5., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.

▼M8

48. Ispitivanu kemikaliju koja ne izazove nikakav agonistički učinak treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je utvrđena tijekom predprobira.

Odabir koncentracija za procjenu antagonističkih učinaka

49. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

50. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:

— ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,

— ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću inhibiciju. Predprobir treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.

51. Kada se pronađe valjani odgovor na dozu treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se uoči najveća inhibicija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.

52. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 6., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.

53. Ispitivane kemikalije koje ne izazovu nikakve antagonističke učinke treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je ispitana tijekom predprobira.

Iscrpni ciklusi

54. Nakon odabira rafiniranih raspona koncentracija ispitivane kemikalije treba iscrpno ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).

55. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablice 3. i 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

▼**M8**

Tablica 5.

Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje agonista

Referentni 17β-estradiol		TCx – ciklus predprobira –		TCx – iscrpni ciklus –		Kontrole	
konc. (M)		razrjeđivanje		razrjeđivanje		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3 * 10^{-6}$
C1	$1 * 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-8}$
C2	$3 * 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1 * 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3 * 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6 * 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1 * 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3 * 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1 * 10^{-10}$						

TCx – ispitivana kemikalija x
PC – pozitivna kontrola (17α-metiltestosteron)
NC – negativna kontrola (kortikosteron)
C0 – kontrola s otapalom referentne norme
SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalije

▼**M8**

Tablica 6.

Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje antagonista

Referentni tamoksifen		TCx – ciklus predprobira –		TCx – iscrpni ciklus –		Kontrole	
konc. (M)		razrjeđivanje		razrjeđivanje		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 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	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 * 10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3 * 10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Obogaćeni agonist**	
C6	$1 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3 * 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3 * 10^{-12}$
C8	$1 * 10^{-5}$						

TCx – ispitivana kemikalija x

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen)

NC – negativna kontrola (resveratrol)

C0 – kontrola s otapalom referentne norme

SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalijeVC – kontrola s nosačem (ne sadržava fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3,0 * 10^{-12}$ M))

▼M8

Prikupljanje i analiza podataka

56. Nakon ciklusa predprobira i iscrpnih ciklusa treba utvrditi EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} i najveću indukciju (TCx_{max}) ispitivane kemikalije za agonističko ispitivanje. Za antagonističko ispitivanje treba izračunati IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} i najmanju indukciju (TCx_{min}). Na slikama 3. (agonizam) i 4. (antagonizam) nalazi se grafički prikaz tih parametara. Potrebni parametri računaju se na temelju relativne indukcije svake ispitivane kemikalije (u odnosu na najveću indukciju referentne norme (= 100 %)). Za procjenu podataka treba upotrebljavati nelinearnu regresiju (varijabilan nagib, četiri parametra) prema sljedećoj jednadžbi:

$$Y = dno + \frac{(\text{vrh} - \text{dno})}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hillov\ nagib)})}$$

pri čemu je:

X = log doze ili koncentracije

Y = odgovor (relativna indukcija (%))

Vrh = najveća indukcija (%)

Dno = najmanja indukcija (%)

$LogEC_{50}$ = log koncentracije pri kojoj se uočava 50 % najvećeg odgovora

Hillov nagib = faktor nagiba ili Hillov nagib

57. Neobrađene podatke iz luminometra, izražene kao relativne jedinice svjetlosti (RLU-ovi), treba prenijeti u proračunsku tablicu za analizu podataka koja je izrađena za cikluse predprobira i iscrpne cikluse. Neobrađeni podaci trebaju ispunjavati kriterije prihvatljivosti kako su navedeni u tablicama 3.A i 3.B (agonizam) ili 4.A i 4.B (antagonizam). Ako neobrađeni podaci ispunjavaju kriterije prihvatljivosti, provode se sljedeći koraci za izračun kako bi se utvrdili potrebni parametri.

Agonizam

— Oduzeti prosječni RLU kontrole s otapalom referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.

— Oduzeti prosječni RLU za kontrolu s otapalom ispitivane kemikalije od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.

— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najviše koncentracije referentne norme na 100 %.

— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najvišom koncentracijom referentne norme kao 100 %.

— Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).

▼**M8**

— Utvrditi EC_{50} i EC_{10} referentne norme.

— Utvrditi EC_{50} i EC_{10} ispitivanih kemikalija.

— Utvrditi najveću relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{max}).

— Utvrditi PC_{10} i PC_{50} ispitivanih kemikalija.

Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti EC_{50}, EC_{10} i PC_{50}. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC_{10} i TC_{max}.

Antagonizam

— Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.

— Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.

— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najniže koncentracije referentne norme na 100 %.

— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najnižom koncentracijom referentne norme kao 100 %.

— Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).

— Utvrditi IC_{50} i IC_{20} referentne norme.

— Utvrditi IC_{50} i IC_{20} ispitivanih kemikalija.

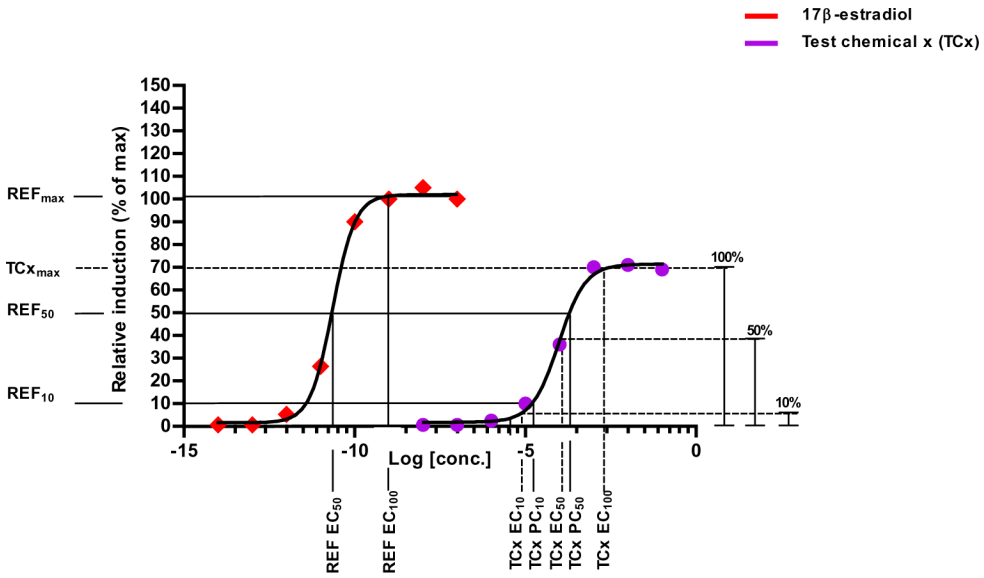
— Utvrditi najmanju relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{min}).

— Utvrditi PC_{80} i PC_{50} ispitivanih kemikalija.

▼M8

Slika 3.

Pregled parametara koji se utvrđuju u testu agonista



EC_{10} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 10 % njezina najvećeg odgovora.

EC_{50} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora.

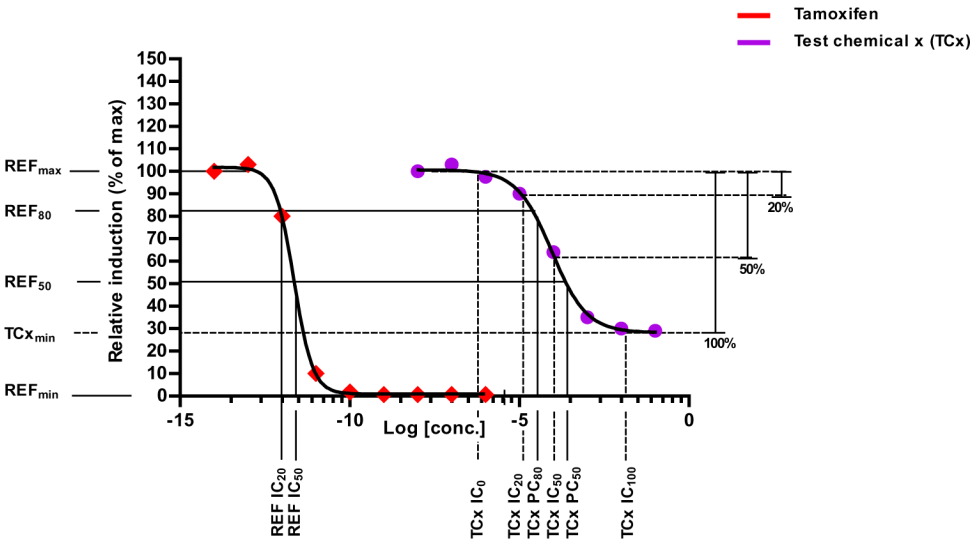
PC_{10} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{10} referentne norme.

PC_{50} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{50} referentne norme.

TCx_{max} = najveća relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Slika 4.

Pregled parametara koji se utvrđuju u testu antagonista



IC_{20} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 80 % njezina najvećeg odgovora (20-postotna inhibicija).

▼**M8**

IC_{50} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora (50-postotna inhibicija).

PC_{80} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC_{20} referentne norme.

PC_{50} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC_{50} referentne norme.

TCx_{min} = najmanja relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti IC_{50}, IC_{20} i PC_{50}. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC_{20} i TC_{min}.

58. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 22. o kriterijima prihvatljivosti),

— biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

59. Za tumačenje podataka i odluku o tome smatra li se ispitivana kemikalija pozitivnom ili negativnom treba primjenjivati sljedeće kriterije.

Agonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{max} jednak ili veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});

2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako TC_{max} nije veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});

2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

Antagonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{min} jednak ili manji od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{80} = 20-postotna inhibicija);

2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{80} ili manje od nje.

▼**M8**

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako je TC_{min} veći od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{80} = 20-postotna inhibicija);

2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF80 ili manje od nje.

60. Kako bi se opisala jakost pozitivnog odgovora ispitivane kemikalije, treba navesti razmjer učinka (agonizam: TC_{max}; antagonizam: TC_{min}) i koncentraciju pri kojoj dolazi do učinka (agonizam: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonizam: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136.–148.

3. Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156.–1166.

4. Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646.–57.

5. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459.–1469.

6. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252.–4263.

7. Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204.–211.

8. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173.–187.

▼**M8**

9. Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769.–771.

10. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67.–73.

11. Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

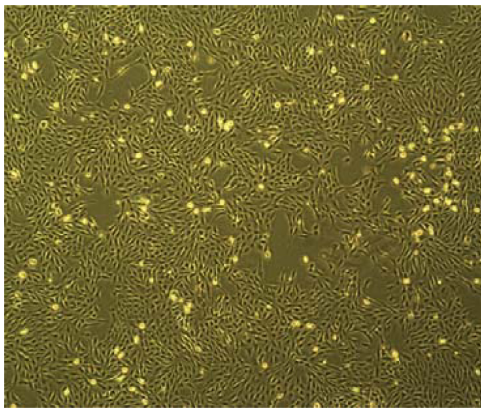
▼**M8**

Dodatak 4.1.

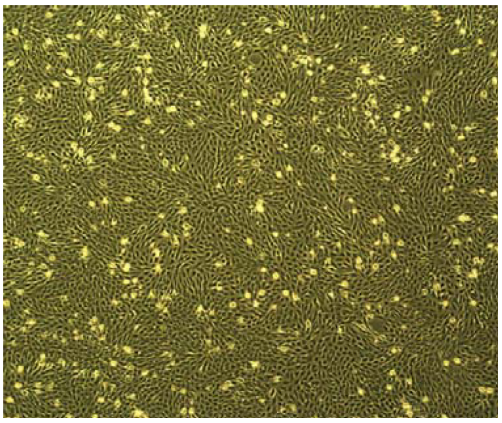
VIZUALNI PREGLED VIJABILNOSTI STANICA



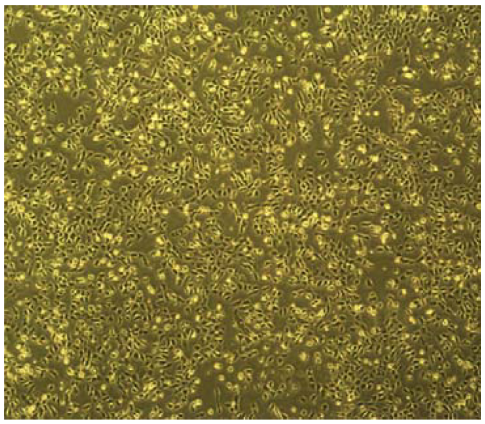
Konfluencija < 5 %. Stanice su tek nasađene. 100-postotna vijabilnost stanica. Razvrstavanje: „nije citotoksično”



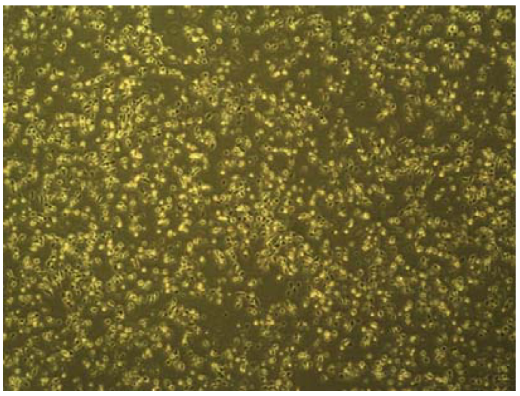
Konfluencija > 85 %. U ovoj se fazi stanice izlažu ispitivanim kemikalijama. Vijabilnost stanica > 95 %.
Razvrstavanje: „nije citotoksično”



Konfluencija > 95 %. Stanice su sabijene i počinju prerastati. Vijabilnost stanica > 95 %. Razvrstavanje: „nije citotoksično”



Vijabilnost stanica < 25 %. Stanice se počinju odvajati i smanjuje se kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”



Vijabilnost stanica < 5 %. Stanice su potpuno odvojene i prekinut je kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”

▼M8

B.67. *IN VITRO* ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA ZA TIMIDIN KINAZU

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 490 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju i revidiraju uzimajući u obzir znanstveni napredak, regulatorne potrebe i dobrobit životinja. Test limfoma miša (MLA) i test TK6 u kojima se upotrebljava lokus timidin kinaze (TK) izvorno su bili dio ispitne metode B.17. Kasnije je Stručna skupina za MLA Međunarodne radionice o ispitivanju genotoksičnosti (IWGT) razvila međunarodno usklađene preporuke za kriterije prihvatljivosti testova i tumačenje podataka za MLA (1., 2., 3., 4. i 5.) i te su preporuke uključene u ovu novu ispitnu metodu B.67. Ova je ispitna metoda napisana za MLA i za test TK6 jer se i u njemu upotrebljava lokus timidin kinaze. Dok se MLA često upotrebljava u regulatorne svrhe, TK6 se upotrebljava mnogo rjeđe. Treba napomenuti da te dvije stanične linije nisu međusobno zamjenjive unatoč sličnosti između krajnjih točaka te se u regulatornim programima s pravom može dati prednost jednoj od tih metoda za određenu regulatornu upotrebu. Na primjer, u validaciji testa MLA pokazala se primjerenost tog testa za otkrivanje genskih mutacija, ali i sposobnost ispitivanih kemikalija da induciraju strukturno oštećenje kromosoma. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (6.).

2. Svrha je *in vitro* testova genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih (uzrokovanih) kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u ovim testovima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije genu za endogenu timidin kinazu (*TK* za ljudske stanice i *Tk* za stanice glodavaca, koje se u ovoj ispitnoj metodi zajedno nazivaju *TK*). Ova ispitna metoda namijenjena je za upotrebu s dvjema staničnim linijama: staničnom linijom limfoma miša L5178Y TK+/–3.7.2C (obično se naziva L5178Y) i staničnom linijom ljudskih limfoblastoida TK6 (obično se naziva TK6). Iako se te dvije stanične linije razlikuju po svojem podrijetlu, rastu stanica, statusu p53 itd., testovi mutacija gena *TK* mogu se provesti na sličan način za obje vrste stanica, kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi.

3. Autosomalna i heterozigotna priroda gena za timidin kinazu omogućuje opažanje vijabilnih kolonija čijim stanicama nedostaje enzim timidin kinaza nakon mutacije iz $TK^{+/-}$ u $TK^{-/-}$. Taj nedostatak može biti posljedica genetskih pojava koje utječu na gen *TK*, uključujući i genske mutacije (točkaste mutacije, mutacije pomaka okvira očitavanja, manje delecije itd.) i kromosomske pojave (velike delecije, premještanja kromosoma i mitotske rekombinacije). Potonje pojave eksprimiraju se kao gubitak heterozigotnosti, a to je uobičajena genetska promjena gena supresora tumora u karcinogeneze kod ljudi. U teoriji se testom MLA može otkriti gubitak cijelog kromosoma koji nosi gen *TK*, što je posljedica oštećenja diobenog vretena i/ili mitotskog nerazdvajanja. Doista, kombinacija citogenetske i molekularne analize jasno pokazuje da su neki mutanti TK u testu MLA posljedica nerazdvajanja. Međutim, analiza snage dokaza ukazuje na to da ispitivanja mutacija gena *TK* ne mogu pouzdano otkriti aneugene kada se primjenjuju standardni kriteriji citotoksičnosti (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i stoga nije primjereno upotrebljavati te testove za otkrivanje aneugena (7., 8. i 9.).

▼**M8**

4. U testovima mutacije gena *TK* nastaju dva različita razreda fenotipa mutanata *TK*: mutanti koji rastu normalno istom brzinom kao i heterozigotne stanice TK-a i mutanti koji rastu sporo i imaju produljeno vrijeme udvostručivanja. Mutanti koji rastu normalno i mutanti koji rastu sporo prepoznaju se kao mutanti u velikim kolonijama i mutanti u malim kolonijama u testu MLA te kao mutanti u kolonijama koje se javljaju rano i koje se javljaju kasno u testu TK6. Molekularna i citogenetska svojstva mutanata u velikim i malim kolonijama u testu MLA podrobno su ispitana (8., 10., 11., 12. i 13.). Podrobno su ispitana i molekularna i citogenetska svojstva mutanata koji se javljaju rano i koji se javljaju kasno u testu TK6 (14., 15., 16. i 17.). Mutanti koji rastu sporo za obje vrste stanica pretrpjeli su genetsko oštećenje koje pogađa gene koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze, što dovodi do produljenih vremena udvostručivanja i nastanka kolonija koje se javljaju kasno ili malih kolonija (18.). Indukcija mutanata koji rastu sporo povezuje se s kemikalijama koje izazivaju velike strukturne promjene na razini kromosoma. Stanice kojima nisu oštećeni geni koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze rastu brzinom koja je slična roditeljskim stanicama i postaju mutanti koji rastu normalno. Indukcija mutanata koji prvenstveno rastu normalno povezana je s kemikalijama koje prvenstveno djeluju kao mutageni koji uzrokuju točkaste mutacije. Stoga je od ključne važnosti izbrojiti i mutante koji rastu sporo i one koji rastu normalno kako bi se dobili svi mutanti i određeni uvid u vrste oštećenja (mutageni u odnosu na klastogene) koje inducira ispitivana kemikalija (10., 12., 18. i 19.).

5. Ispitna metoda organizirana je tako da se daju opće informacije koje se primjenjuju i na MLA i TK6 te specijalizirane smjernice za pojedinačne testove.

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

7. Testovi koji se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog (vanjskog) izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.

8. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi mogli dovesti do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani interakcijom ispitivane kemikalije i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti, interakciju s komponentama medija (20. i 21.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (22., 23. i 24.). Citotoksičnost koja premašuje preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 28., smatra se prekomjernom za MLA i TK6. Osim toga, treba napomenuti da ispitivane kemikalije koje su analogne timidinu ili se ponašaju kao da su analogne timidinu mogu povećati učestalost pojave mutanata selektivnim rastom spontanih pozadinskih mutanata tijekom tretiranja stanica te su za primjerenu procjenu potrebne dodatne ispitne metode (25.).

9. U slučaju proizvedenih nanomaterijala mogu biti potrebne posebne prilagodbe ove ispitne metode, ali one nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.

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

▼M8

11. Mutirane stanice bez aktivnosti enzima timidin kinaze otporne su na citostatske učinke analoga primidona, trifluorotimidina (TFT), zbog mutacije $TK^{+/-}$ u $TK^{-/-}$. Stanice koje sadržavaju dosta *TK-a* osjetljive su na TFT, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava daljnju diobu stanica. Tako se mutirane stanice uz prisutnost TFT-a mogu razmnožavati i stvarati vidljive kolonije, dok stanice koje sadržavaju enzim TK ne mogu.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Stanice u suspenziji izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj kemikaliji (vidjeti stavak 33.), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti stavak 19.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata. Citotoksičnost se utvrđuje relativnim ukupnim rastom (RTG – vidjeti stavak 25.) za MLA i relativnom stopom preživljavanja (RS – vidjeti stavak 26.) za TK6. Tretirane se kulture drže u mediju za rast tijekom dovoljno dugog razdoblja, koje je karakteristično za svaki tip stanice (vidjeti stavak 37.), što omogućuje skoro optimalnu fenotipsku ekspresiju induciranih mutacija. Nakon fenotipske ekspresije učestalost pojave mutanata utvrđuje se nasađivanjem poznatog broja stanica u medij koji sadržava selektivni agens kako bi se otkrile kolonije mutanata odnosno u medij bez selektivnog agensa kako bi se odredila učinkovitost kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg razdoblja inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

13. Za MLA: budući da je MLA razvijen i opisan za upotrebu podlinije $TK^{+/-}$ –3.7.2C stanica L5178Y, za MLA se mora upotrebljavati upravo ta podlinija. Stanična linija L5178Y izvedena je iz limfoma timusa DBA-2 miša induciranog metilkolantrenom (26.). Clive i suradnici tretirali su stanice L5178Y (koje je Clive odredio kao $TK^{+/+}$ –3) etil metansulfonatom i izolirali klon $TK^{-/-}$ (određen kao $TK^{-/-}$ –3.7) primjenom bromodeoksiuridina kao selektivnog agensa. Iz klona $TK^{-/-}$ izolirani su spontani klon $TK^{+/-}$ (određen kao $TK^{+/-}$ –3.7.2.) i podklon (određen kao $TK^{+/-}$ –3.7.2C) te su opisani za upotrebu u testu MLA (27.). Objavljen je kariotip za staničnu liniju (28., 29., 30. i 31.). Modalni je broj kromosoma 40. Postoji jedan metacentrični kromosom (t12;13) koji treba brojiti kao jedan kromosom. Lokus timidin kinaze miša nalazi se na distalnom kraju kromosoma 11. Stanična linija L5178Y $TK^{+/-}$ –3.7.2C ima mutacije na oba alela p53 i proizvodi protein mutanta p53 (32. i 33.). Status p53 stanične linije $TK^{+/-}$ –3.7.2C vjerojatno omogućuje da se testom otkrije veliko oštećenje (17.).

14. Za TK6: TK6 je stanična linija ljudskih limfoblastoida. Roditeljsku staničnu liniju čini WI-L2, stanična linija transformirana Epstein-Barrovim virusom, koja je izvorno izvedena iz petogodišnjeg mužjaka s hereditarnom sferocitozom. Prvi izolirani klon, HH4, mutageniran je mutagenom ICR191 i stvorena je heterozigotna stanična linija *TK-a* – TK6 (34.). Stanice TK6 skoro su diploidne i reprezentativni je kariotip 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35.). Lokus ljudske timidin kinaze nalazi se na dugom kraku kromosoma 17. TK6 je stanična linija kompetentna u pogledu p53 jer ima slijed p53 divljeg tipa na oba alela i eksprimira samo protein p53 divljeg tipa (36.).

▼M8

15. I kod testa MLA i testa TK6 preporučuje se da laboratorij koji obavlja ispitivanje osigura odsustvo kontaminacije mikoplazmom, odredi kariotip stanica ili oboji kromosome koji imaju lokus timidin kinaze te da provjeri vremena udvostručenja populacije kada se glavni uzorak prvi put stvara ili nadopunjuje. Trebalo bi utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa upotrijebljenih stanica u ispitnom laboratoriju i ono bi trebalo biti usklađeno s objavljenim svojstvima stanica (16., 19. i 37.). Taj glavni uzorak treba pohraniti na temperaturi od –150 °C ili nižoj i upotrebljavati za pripremu svih radnih uzoraka stanica.

16. Prije stvaranja velikog broja krioprezerviranih radnih uzoraka ili neposredno prije upotrebe u pokusu iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje postoje otprije [osim ako je učestalost pojave mutanata (MF) u kontroli s otapalom već unutar prihvatljivog raspona – vidjeti tablicu 2. za test MLA)]. To se postiže upotrebom metotreksata (aminopterin) kako bi se izdvojile stanice koje ne sadržavaju timidin kinazu te dodavanjem timidina, hipoksantina i glicina (L5178Y) ili 2'-deoksicitidina (TK6) kulturi kako bi se osigurao optimalan rast stanica kompetentnih u pogledu timidin kinaze (19., 38., 39. i 40.) za test TK6. Opći savjeti o dobroj praksi za održavanje staničnih kultura i savjeti specifični za stanice L5178Y i TK6 mogu se naći u literaturi (19., 31., 37., 39. i 41.). Za laboratorije koji trebaju matične uzorke za započinjanje testa MLA ili TK6 ili za dobivanje novih matičnih uzoraka dostupan je repozitorij stanica koje su dobro opisane (37.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati mediji i kulture

17. U oba bi testa u svrhu održavanja kultura trebalo primijeniti prikladne uvjete za medij za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (npr. posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO_2 i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete u pogledu medija i kultura kojima se osiguravaju optimalan rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i kloniranje kako mutiranih tako i nemutiranih stanica. Za MLA i TK6 važno je i da uvjeti kulture osiguraju optimalan rast TK mutanata i u velikim kolonijama/mutanata koji se javljaju rano i mutanata u malim kolonijama/mutanata koji se javljaju kasno. Više pojedinosti o kulturi, uključujući potrebu da se konjski serum pravilno inaktivira toplinom ako se tijekom selekcije mutanata upotrebljava medij RPMI, dostupno je u literaturi (19., 31., 38., 39., 40. i 42.).

Priprema kultura

18. Stanice se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustoćom da kulture u suspenziji nastave eksponencijalno rasti tijekom razdoblja tretiranja i ekspresije.

Metabolička aktivacija

19. Kod uporabe stanica L5178Y i TK6 trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja jer te stanice nemaju odgovarajuću endogenu metaboličku sposobnost. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodavaca (općenito štakora), koja je bila tretirana sredstvima za indukciju enzima, kao što je Aroclor 1254 (43., 44. i 45.), ili mješavinom fenobarbitala i β-naftoflavona (46., 47., 48., 49., 50. i 51.). Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (52.) i dokazano je da je jednako učinkovita za indukciju oksidaza

▼M8

s miješanom funkcijom kao Aroclor 1254 (45., 46., 47., 48. i 49.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 %, ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija ispitivanih kemikalija.

Priprema ispitivane kemikalije

20. Prije tretiranja stanica krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti (vidjeti stavak 21.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (53., 54. i 55.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI UVJETI

Otapala

21. Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivane kemikalije bez negativnih učinaka na provedbu testa, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala voda ili dimetilsulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), dok vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u mediju za završno tretiranje. Upotrebu neuobičajenih otapala (npr. etanola ili acetona) potrebno je opravdati podacima koji govore da su ta otapala kompatibilna s ispitivanim kemikalijama i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje takvi popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1., Definicije) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo nema štetne ili mutagene učinke.

MJERENJE CITOTOKSIČNOSTI I ODABIR KONCENTRACIJA TRETIRANJA

22. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 28.), taloženje u mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 29.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 8.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.

23. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 27.–30.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Ako se provodi pokus za utvrđivanje raspona, on treba obuhvatiti širok raspon koncentracija i može se završiti 1. dana nakon tretiranja ili nastaviti na 2. dan ekspresije i do selekcije mutanata (ako se pokaže da su upotrijebljene koncentracije primjerene).

▼**M8**

24. Citotoksičnost treba utvrditi za svaku pojedinačnu ispitnu kulturu i kontrolnu kulturu: metode za MLA (2.) i TK6 (15.) utvrđene su međunarodno prihvaćenom praksom.

25. I za verziju testa MLA s agarom i s mikrojažicama citotoksičnost treba procijeniti upotrebom relativnog ukupnog rasta (RTG), koji su izvorno definirali Clive i Spector 1975. (2.). Ta mjera uključuje relativni rast u suspenziji (RSG: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) tijekom tretiranja stanica, vrijeme ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) u trenutku odabira mutanata (2.). Treba napomenuti da RSG obuhvaća bilo kakav gubitak stanica do kojeg dolazi u ispitnoj kulturi tijekom tretiranja (formule potražiti u Dodatku 2.).

26. Za TK6: citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja (RS), tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica u usporedbi s negativnom kontrolom (kojoj se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).

27. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (55.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, treba odabrati koncentracije koje obuhvaćaju raspon citotoksičnosti od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost kako je opisano u stavku 28. te uključujući koncentracije pri kojima se javlja umjerena citotoksičnost i one pri kojima je citotoksičnost mala ili je nema. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili podrobno istraživanje odgovora na koncentracije možda biti potrebno upotrijebiti sličnije koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 70.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kada se upotrebljava jedna kultura.

28. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti relativni ukupni rast od 20 do 10 % za MLA i relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 % za TK6 (stavak 67.).

29. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Budući da se u testovima MLA i TK6 upotrebljavaju kulture u suspenziji, posebnu pozornost treba posvetiti tome da se osigura da talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno i odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.

▼M8

30. Ako nisu uočeni talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (57. i 58.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvari), proizvodima ekstrahiranima iz okoliša itd., najvišu koncentraciju može biti potrebno povećati (npr. 5 mg/ml) u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, a kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.).

Kontrole

31. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti i istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 21.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao i kulture za tretiranje.

32. Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja, učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije (ako je primjenjivo) i za dokazivanje primjerenog otkrivanja i malih *TK* mutanata/mutanata koji se javljaju kasno i velikih *TK* mutanata/mutanata koji se javljaju rano. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne tvari za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano za kratkotrajna tretiranja (od tri do četiri sata) koja se istodobno provode s metaboličkom aktivacijom i bez nje uz isto trajanje tretiranja, upotreba pozitivnih kontrola može se ograničiti na mutagene tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Ako se upotrebljava, dugotrajno tretiranje (tj. 24 sata bez S9) trebalo bi imati svoju pozitivnu kontrolu jer će se trajanje tretiranja razlikovati od ispitivanja u kojem se primjenjuje metabolička aktivacija. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ovoj ispitnoj metodi (vidjeti stavak 28.).

Tablica 1.

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

Kategorija	Tvar	CAS br.
1. Mutageni aktivni bez metaboličke aktivacije		
	Metil metansulfonat	66-27-3
	Mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oksid	56-57-5
2. Mutageni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetilbenzantracen	57-97-6
	3-metilkolantren	56-49-5

▼M8

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

33. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisustvo i odsustvo sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do četiri sata). Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.). Kod testa MLA u slučajevima kada se kratkotrajnim tretiranjem dobiju negativni rezultati, a postoje informacije koje ukazuje na potrebu za duljim tretiranjem (npr. nukleozidni analozi, slabo topljive kemikalije (5. i 59.)), treba razmotriti provođenje testa s duljim tretiranjem, tj. 24 sata bez S9.

34. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasažirati dovoljno stanica u svakoj pokusnoj kulturi kako bi se održalo najmanje deset, ali po mogućnosti 100 spontanih mutanata u svim fazama testa (tretiranje, fenotipska ekspresija i selekcija mutanata) (56.).

35. Za test MLA preporučuje se prihvatljiva učestalost spontanih mutanata od 35–140 × 10^{-6} (verzija s agarom) i 50–170 × 10^{-6} (verzija s mikrojažicama) (vidjeti tablicu 2.). Da bi se dobilo najmanje deset, a po mogućnosti 100 spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku ispitnu kulturu treba tretirati najmanje 6 × 106 stanica. Tretiranjem tog broja stanica i održavanjem dovoljnog broja stanica tijekom ekspresije i kloniranja za selekciju mutanata dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više) tijekom svih faza pokusa, čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost (kako je izmjereno relativnim ukupnim rastom od 10 %) (19., 38. i 39.).

36. Za test TK6 učestalost spontanih mutanata općenito iznosi od 2 do 10 × 10^{-6}. Da bi se dobilo najmanje deset spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku kulturu treba tretirati najmanje 20 × 106 stanica. Tretiranjem tog broja stanica dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više), čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %). Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (60.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje citotoksičnosti i učestalosti pojave mutanata

37. Na kraju razdoblja tretiranja stanice se kultiviraju u zadanom vremenskom razdoblju kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoinduciranih mutacija; specifično za svaku staničnu liniju. Za test MLA razdoblje fenotipske ekspresije iznosi dva dana. Za test TK6 razdoblje fenotipske ekspresije iznosi od tri do četiri dana. Ako se upotrebljava tretiranje u trajanju od 24 sata, razdoblje ekspresije počinje nakon kraja tretiranja.

38. Tijekom razdoblja fenotipske ekspresije stanice se prebrojavaju svakog dana. Kod testa MLA svakodnevno brojanje stanica upotrebljava se za izračun svakodnevnog rasta u suspenziji (SG). Nakon dvodnevnog razdoblja ekspresije stanice se suspendiraju u mediju sa selektivnim agensom ili bez njega radi utvrđivanja broja mutacija (ploče za odabir) i učinkovitosti kloniranja (ploče za vijabilnost). Za test MLA postoje dvije jednako prihvatljive metode za kloniranje selekcije mutanata; u jednoj se upotrebljava meki agar, a u drugom tekući medij u pločama s 96 jažica (19., 38. i 39.). Kloniranje u testu TK6 provodi se upotrebom tekućih medija i ploča s 96 jažica (16.).

▼M8

39. Za *TK* mutante kao selektivni agens preporučuje se samo trifluorotimidin (TFT) (61).

40. Kod testa MLA agarne ploče i ploče s mikrojažicama prebrojavaju se nakon 10–12 dana inkubacije. Kod testa TK6 kolonije u pločama s mikrojažicama ocjenjuju se nakon 10–14 dana kako bi se uočili mutanti koji se javljaju rano. Kako bi se obnovili TK6 mutanti koji rastu sporo (koji se javljaju kasno), stanicama treba ponovno dodati medij za uzgoj i TFT nakon što se prebroje mutanti koji se javljaju rano i zatim inkubirati ploče dodatnih 7–10 dana (62.). Za pojedinosti o prebrojavanju TK mutanata koji rastu sporo i onih koji rastu normalno vidjeti stavke 42. i 44.

41. Odgovarajući izračuni za dva testa, uključujući i dvije metode (agar i mikrojažice) za test MLA, nalaze se u Dodatku 2. Kod metode testa MLA u kojoj se upotrebljava agar, za izračun učestalosti pojave mutanata kolonije se prebrojavaju i broj kolonija mutanata prilagođava se s obzirom na učinkovitost kloniranja. Kod verzije testova MLA i TK6 s mikrojažicama, učinkovitost kloniranja i za ploče za selekciju i za ploče za učinkovitost kloniranja (63.) utvrđuje se u skladu s Poissonovom distribucijom. Učestalost pojave mutanata računa se iz tih dviju učinkovitosti kloniranja.

Opis kolonije mutanata

42. Kod testa MLA, ako je ispitivana kemikalija pozitivna (vidjeti stavke od 62. do 63.), opisivanje kolonije razvrstavanjem po veličini kolonije ili po njezinom rastu treba provesti na najmanje jednoj od ispitnih kultura (obično najviša prihvatljiva pozitivna koncentracija) te na negativnim i pozitivnim kontrolama. Ako je ispitivana kemikalija negativna (vidjeti stavak 64.), opisivanje kolonije mutanata treba provesti na negativnim i pozitivnim kontrolama. Kod metode testa MLA s mikrojažicama mutanti koji tvore male kolonije definiraju se kao mutanti koji prekrivaju manje od 25 % promjera jažice, a mutanti koji tvore velike kolonije kao oni koji prekrivaju više od 25 % promjera jažice. Kod metode s agarom za prebrojavanje kolonija mutanata i razvrstavanje kolonija po veličini upotrebljava se automatski brojač kolonija. Pristupi razvrstavanju kolonija po veličini podrobno su opisani u literaturi (19., 38. i 40.). Opis kolonija na negativnoj i pozitivnoj kontroli potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način.

43. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji tvore velike kolonije i oni koji tvore male kolonije. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).

44. TK6: mutanti koji rastu normalno i oni koji rastu sporo razlikuju se prema različitim vremenima inkubacije (vidjeti stavak 40.) Kod testa TK6 mutanti koji se javljaju rano i oni koji se javljaju kasno obično se ocjenjuju za sve kulture, uključujući negativne i pozitivne kontrole. Opis kolonija negativne i pozitivne kontrole potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji se javljaju rano i mutanti koji se javljaju kasno. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).

▼M8

Osposobljenost laboratorija

45. Kako bi dokazao da ima dovoljno iskustva u izvođenju testa prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (uključujući netretirane kulture i različita otapala/nosače). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom prijašnjih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavaka 47.–50. Kod testa MLA vrijednosti koje se dobiju i za pozitivne i za negativne kontrole trebaju biti u skladu s preporukama IWGT-a (vidjeti tablicu 2.).

46. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1.) trebao bi se ispitati s kratkim i dugim tretiranjima (ako se upotrebljavaju duga tretiranja) u odsustvu metaboličke aktivacije i kratkim tretiranjima u prisustvu metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje djelotvornosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinu, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

47. Laboratorij bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,

— raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).

48. Pri prvom bi dobivanju podataka za distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama istodobne negativne kontrole trebale biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim kontrolama. Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (64. i 65.).

49. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, međutim bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami; 65.), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama i dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (66.). Daljnje pojedinosti i preporuke o tome kako izraditi i upotrebljavati prijašnje podatke mogu se pronaći u literaturi (64.).

50. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 27. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih negativnih kontrola koje se nalaze u bazi podataka laboratorija. Ako se podaci o negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 49.) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.

▼M8

51. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to jesu li podaci u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

52. Predstavljanje podataka i za test MLA i za test TK6 treba uključivati, i za tretirane i kontrolne kulture, podatke potrebne za izračun citotoksičnosti (relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja) i učestalosti pojave mutanata, kako je opisano u nastavku.

53. Kod testa MLA treba navesti podatke o pojedinačnim kulturama za relativni rast u suspenziji, relativni ukupni rast, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj kolonija mutanata (za verziju s agarom) ili broj praznih jažica (za verziju s mikrojažicama). Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na milijun preživjelih stanica. Ako je odgovor pozitivan, učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) treba navesti za barem jednu koncentraciju ispitivane kemikalije (obično najviša pozitivna koncentracija) te negativne i pozitivne kontrole. U slučaju negativnog odgovora učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama treba navesti za negativnu i pozitivnu kontrolu.

54. Kod testa TK6 podatke o pojedinačnim kulturama treba navesti za relativnu stopu preživljavanja, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj praznih jažica za mutante koji se javljaju rano i one koji se javljaju kasno. Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na broj preživjelih stanica, a treba uključivati ukupnu učestalost pojave mutanata te učestalost pojave mutanata (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) koji se javljaju rano i onih koji se javljaju kasno.

Kriteriji prihvatljivosti

55. I za test MLA i za test TK6 treba ispuniti sljedeće kriterije prije nego što se utvrde ukupni rezultati za određenu ispitivanu kemikaliju:

— provedena su dva pokusna uvjeta (kratko tretiranje s metaboličkom aktivacijom i bez nje – vidjeti stavak 33.), osim ako je jedan doveo do pozitivnih rezultata,

— odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 27., 34.–36.),

— kriteriji za odabir najveće koncentracije u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 28.–30.

Kriteriji prihvatljivosti za negativne i pozitivne kontrole

56. Analiza velike količine podataka iz testova MLA koju je provela IWGT-ova Stručna skupina za MLA dovela je do međunarodnog konsenzusa u pogledu specifičnih kriterija prihvatljivosti za test MLA (1., 2., 3., 4. i 5.). Stoga se u toj ispitnoj metodi navode specifične preporuke za utvrđivanje prihvatljivosti negativnih i pozitivnih kontrola te za procjenu rezultata pojedinačnih tvari u testu MLA. Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala.

▼M8

57. Kod testa MLA svaki pokus treba procijeniti s obzirom na to ispunjava li netretirana kontrola/kontrola s otapalom kriterije prihvatljivosti IWGT-ove Stručne skupine za MLA (4. i tablica 2. u nastavku) za: 1. učestalost pojave mutanata (treba napomenuti da se IWGT-ove prihvatljive učestalosti pojave mutanata razlikuju za verzije testa MLA s agarom i mikrojažicama); 2. učinkovitost kloniranja (CE) u trenutku selekcije mutanata i 3. rast u suspenziji (SG) za kontrolu s otapalom (formule potražiti u Dodatku 2.).

Tablica 2.

Kriteriji prihvatljivosti za MLA

Parametar	Metoda s mekim agarom	Metoda s mikrojažicama
Učestalost pojave mutanata	35 – 140 × 10^{-6}	50 – 170 × 10^{-6}
Učinkovitost kloniranja	65–120 %	65–120 %
Rast u suspenziji	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)

58. Kad je riječ o testu MLA, svaki test treba procijeniti i u pogledu toga ispunjavaju li pozitivne kontrole barem jedan od sljedeća dva kriterija prihvatljivosti koje je razvila stručna skupina IWGT-a:

— pozitivna kontrola trebala bi pokazati apsolutno povećanje ukupne učestalosti pojave mutanata, tj. povećanje veće od pozadinske učestalosti pojave spontanih mutanata (inducirana učestalost pojave mutanata (IMF)) od najmanje 300 × 10^{-6}. Najmanje 40 % IMF-a trebalo bi se odraziti u učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji,

— pozitivna kontrola pokazuje povećanje učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji koje je za najmanje 150 × 10^{-6} veće od učestalosti u istodobnoj netretiranoj kontroli/kontroli s otapalom (IMF u malim kolonijama od 150 × 10^{-6}).

59. Kad je riječ o testu TK6, test će biti prihvatljiv ako se istodobna negativna kontrola smatra prihvatljivom za dodavanje u bazu podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama kako je opisano u stavcima 48.–49. Osim toga, istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 32.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s onima generiranima u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama te dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu.

60. Kod oba bi testa gornja granica citotoksičnosti uočene kod pozitivne kontrolne kulture trebala biti ista kao i kod pokusnih kultura. Drugim riječima, relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja ne bi trebali biti manji od 10 %. Dovoljno je upotrijebiti jednu koncentraciju (ili jednu od koncentracija pozitivnih kontrolnih kultura ako se upotrebljava više koncentracija) kako bi se dokazalo da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu. Nadalje, učestalost pojave mutanata pozitivne kontrole mora biti unutar prihvatljivog raspona utvrđenog za laboratorij.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

61. Za test MLA znatan posao u vezi s biološkom relevantnosti i kriterijima za pozitivni odgovor obavila je IWGT-ova stručna skupina za limfome miša (4.). Stoga se u ovoj ispitnoj metodi pružaju specifične preporuke za

▼M8

tumačenje rezultata ispitivanih kemikalija iz testa MLA (vidjeti stavke 62.–64.). Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala. Stoga su preporuke za tumačenja podataka za test TK6 općenitije (vidjeti stavke 65.–66.). Dodatne preporuke primjenjuju se na oba testa (vidjeti stavke 67.–71.).

MLA

62. Preporučuje se pristup za utvrđivanje pozitivnih i negativnih odgovora kako bi se osiguralo da je povećana učestalost pojave mutanata biološki relevantna. Umjesto statističke analize koja se obično upotrebljava za ostale testove, ovaj se pristup oslanja na upotrebu unaprijed utvrđene inducirane učestalosti pojave mutanata (tj. povećanje učestalosti pojave mutanata veće nego u istodobnoj kontroli), određene kao globalni evaluacijski faktor (GEF), koji se temelji na analizi distribucije podataka o učestalosti pojave mutanata u negativnoj kontroli iz uključenih laboratorija (4.). Kod verzije testa s agarom GEF iznosi 90×10^{-6}, a za verziju testa MLA s mikrojažicama GEF iznosi 126×10^{-6}.

63. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem ispitanom pokusnom uvjetu (vidjeti stavak 33.) povećanje učestalosti pojave mutanata u odnosu na istodobno provedeno pozadinsko mjerenje veće od GEF-a te je povezano s koncentracijom (npr. upotrebom testa trenda). Tada se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

64. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitnim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.) nema odgovora povezanog s koncentracijom ili, ako postoji povećanje učestalosti pojave mutanata, ono nije veće od GEF-a. Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

TK6

65. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta (vidjeti stavak 33.):

— najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji uočeno je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom (vidjeti stavak 33.),

— bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Kada su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (66. i 67.).

66. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.):

— ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije uočeno statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,

— odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,

▼M8

— svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

I za test MLA i za test TK6:

67. Ako se najveća koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti RTG/RS od 20 do 10 %. Konsenzus je da treba oprezno tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo u rasponu RTG-a/RS-a od 20 do 10 % te da se rezultat neće smatrati pozitivnim ako je do povećanja učestalosti pojave mutanata došlo samo kod RTG-a/RS-a od 10 % ili manjeg (ako se procjenjuje) (2. i 59.).

68. Postoje određene okolnosti u kojima dodatne informacije mogu pomoći u utvrđivanju da ispitivana kemikalija nije mutagena ako nema kulture koja pokazuje vrijednost RTG-a od 10 do 20 % RTG-a/RS-a. Te su situacije sažete u nastavku teksta. 1. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 20 % RTG-a/RS-a te postoji barem jedna podatkovna točka u rasponu od 20 do 25 % RTG-a/RS-a. 2. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 25 % RTG-a/RS-a te postoji i negativna podatkovna točka koja je malo niža od 10 % RTG-a/RS-a. U te dvije situacije može se zaključiti da je ispitivana kemikalija negativna.

69. Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

70. Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano i/ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti pokus, eventualno u izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija kako bi se povećala vjerojatnost dobivanja podatkovnih točaka u rasponu od 10 do 20 % RTG-a/RS-a, upotreba drugih uvjeta metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9) i trajanje tretiranja).

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

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

72. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,

▼M8

— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Otapalo:

— obrazloženje odabira otapala,

— postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

za laboratorijske glavne kulture:

— vrsta i izvor stanica te prethodna upotreba u ispitnom laboratoriju,

— kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,

— metode održavanja staničnih kultura,

— odsustvo mikoplazme,

— vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

— obrazloženje odabira koncentracija i broja staničnih kultura, uključujući, npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,

— sastav medija, koncentracija CO_2, razina vlažnosti,

— koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),

— koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,

— temperatura inkubacije,

— vrijeme inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— gustoća stanica za vrijeme tretiranja,

▼**M8**

— vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9),

— tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,

— dužina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasađenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),

— identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,

— kod testa MLA treba navesti primijenjenu metodu (agar ili mikrojažice),

— kriteriji prihvatljivosti testova,

— metode korištene za prebrojavanje vijabilnih i mutiranih stanica,

— metode mjerenja citotoksičnosti,

— sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,

— trajanje inkubacije nakon nasađivanja,

— definicija kolonija kod kojih se razmatra veličina i vrsta (uključujući kriterije za „male” i „velike” kolonije, ako je primjereno),

— kriteriji prema kojima se studija smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom,

— metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti i osmolalnosti, ako se provode, te za određivanje taloženja, ako je relevantno.

Rezultati:

— broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,

— parametri toksičnosti (RTG za MLA i RS za TK6),

— znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,

— broj stanica nasađenih u selektivni i neselektivni medij,

— broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,

— razvrstavanje kolonija po veličini za negativne i pozitivne kontrole, a ako je ispitivana kemikalija pozitivna, najmanje jedna koncentracija i povezane učestalosti pojave mutanata,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

— podaci o istodobnim negativnim kontrolama (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),

— podaci o prijašnjim negativnim (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala) s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, broj ispitivanja na kojima se temelje kontrole iz prijašnjih ispitivanja,

▼M8

— statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje, te procjena GEF-a za test MLA.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185.–190.

2. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (travanj 2000.), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292.–299.

3. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127.–140.

4. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1.–5.

5. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36.–40.

6. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.

7. Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21.–28.

8. Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101.–114.

▼**M8**

9. Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol.* Sci., 109 (1): 96.–105.

10. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. SAD, 87 (1): 51.–55.

11. Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169.–181.

12. Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237.–242.

13. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161.–174.

14. Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143.–153.

15. Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77.–87.

16. Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89.–98.

17. Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203.–14.

18. Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89.–95.

19. Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27.–50.

20. Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177.–183.

21. Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439.–452.

22. Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879.–886.

23. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297.–305.

▼**M8**

24. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147.–204.

25. Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185.–190.

26. Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673.–680.

27. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/$TK^{+/-}$-Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61.–108.

28. Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243.–253.

29. Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181.–193.

30. Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127.–131.

31. Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35.–42.

32. Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157.–165.

33. Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263.–268.

34. Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411.–416.

35. Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162.–176.

36. Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12.–15.

▼**M8**

37. Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).

38. Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

39. Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. U: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell (Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

40. Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467.–485.

41. Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261.–287.

42. Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287.–294.

43. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347.–364.

44. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173.–215.

45. Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83.–90.

46. Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277.–290.

47. Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4 (1): 55.–65.

48. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175.–177.

49. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.

▼**M8**

50. Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241.–261.

51. Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51.–59.

52. UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

53. Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. U: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.) New York, Plenum, str. 91.–103.

54. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795.–801.

55. Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122.–130.

56. Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, str. 66.–101.

57. Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32.–56.

58. Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36.–43.

59. USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupno na: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

60. Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373.–384.

61. Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363.–378.

62. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9.–17.

63. Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1.–8.

64. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87.–90.

▼**M8**

65. Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

66. OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 199), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

67. Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneugen: svaka kemikalija ili postupak koji u interakciji s elementima mitotičkog i mejotičkog ciklusa diobe stanice uzrokuje aneuploidiju u stanicama ili organizmima.

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

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

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

Klastogen: svaka kemikalija ili proces koji uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili organizama.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom citotoksičnost se definira kao smanjenje relativnog ukupnog rasta (RTG) za MLA ili relativne stope preživljavanja (RS) za TK6.

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

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

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

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

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

Učestalost pojave mutanata (MF): broj uočenih mutiranih stanica podijeljen brojem vijabilnih stanica.

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

Relativna stopa preživljavanja (RS): relativna stopa preživljavanja upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu TK6. To je relativna učinkovitost kloniranja (CE) stanica koje se nasade odmah nakon što ih se tretira, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole.

▼M8

Relativni rast u suspenziji (RSG): kod testa MLA, relativni ukupni rast ispitivane kulture u suspenziji tijekom dva dana u usporedbi s ukupnim rastom negativne kontrole/kontrole s otapalom u suspenziji tijekom dva dana (Clive i Spector, 1975.). Relativni rast u suspenziji treba uključivati relativni rast ispitivane kulture u usporedbi s negativnom kontrolom/kontrolom s otapalom tijekom razdoblja tretiranja.

Relativni ukupni rast (RTG): relativni ukupni rast upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu MLA. To je mjera relativnog (u odnosu na kontrolu s nosačem) rasta ispitivanih kultura tijekom faza tretiranja, dvodnevne ekspresije i kloniranja selekcije mutanata u testu. Relativni ukupni rast svake ispitivane kulture množi se relativnom učinkovitošću kloniranja ispitivane kulture u trenutku selekcije mutanata i izražava se u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole/kontrole s otapalom (Clive i Spector, 1975.).

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

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

Rast u suspenziji (SG): multiplikacijski faktor povećanja broja stanica tijekom faza tretiranja i ekspresije testa MLA. Kod kratkog tretiranja (tri ili četiri sata) rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja prvog dana pomnoži s multiplikacijskim faktorom povećanja drugog dana. Ako se upotrebljava 24-satno tretiranje, rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja tijekom 24-satnog tretiranja pomnoži multiplikacijskim faktorima povećanja prvog i drugog dana.

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

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

Netretirane kontrole: netretirane kontrole kulture su koje nisu ni s čim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju na isti način kao kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

▼M8

Dodatak 2.

FORMULE

Citotoksičnost

Za obje verzije testa MLA (s agarom i mikrojažicama)

Citotoksičnost se definira kao relativni ukupni rast (RTG), što uključuje relativni rast u suspenziji (RSG) tijekom dvodnevnog razdoblja ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE) dobivenu u trenutku selekcije mutanata. RTG, RSG i RCE izražavaju se kao postotak.

Izračun RSG-a: rast u suspenziji jedan (SG_1) stopa je rasta od nultog do prvog dana (koncentracija stanica prvog dana/koncentracija stanica nultog dana), a rast u suspenziji dva (SG_2) stopa je rasta od prvog do drugog dana (koncentracija stanica drugog dana/koncentracija stanica prvog dana). RSG je ukupni SG (SG_1 x SG_2) za tretiranu kulturu u usporedbi s netretiranom kontrolom/kontrolom s otapalom. To jest: RSG = $[SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}]$ /$[SG_{1(kontrola)}$ x $SG_{2(kontrola)}]$. SG_1 treba izračunati iz početne koncentracije stanica koja je upotrijebljena na početku tretiranja stanica. Time se uzima u obzir bilo kakva diferencijalna citotoksičnost do koje dolazi u ispitivanim kulturama tijekom tretiranja stanica.

RCE je relativna učinkovitost kloniranja ispitivane kulture u usporedbi s relativnom učinkovitošću kloniranja netretirane kontrole/kontrole s otapalom dobivena u trenutku selekcije mutanata.

Relativni ukupni rast (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Relativna stopa preživljavanja (RS):

Citotoksičnost se procjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %). Prilagodba za gubitak stanica tijekom tretiranja može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{Prilagođeni CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Broj stanica na kraju tretiranja}}{\textit{Broj stanica na početku tretiranja}}$$

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

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

Učestalost pojave mutanata za testove MLA i TK6

Učestalost pojave mutanata (MF) učinkovitost je kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju (CE_M), prilagođeno s obzirom na učinkovitost kloniranja u neselektivnom mediju u trenutku selekcije mutanata (CE_V). Drugim riječima, MF = CE_M/CE_V. Izračun tih dviju učinkovitosti kloniranja za metode kloniranja s agarom i mikrojažicama opisan je u nastavku.

▼**M8**

***Verzija testa MLA s agarom*:** u verziji testa MLA s mekim agarom broj kolonija na ploči za selekciju mutanata (C_M) i broj kolonija na neprobranoj ploči ili ploči za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (C_V) dobiva se izravnim brojanjem klonova. Ako se 600 stanica nasadi na ploče za selekciju mutanata (CE_M) za učinkovitost kloniranja (CE) te na neprobrane ploče ili ploče za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (CE_V) te se za selekciju mutanata upotrijebi 3×10^6 stanica,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Verzija testova MLA i TK6 s mikrojažicama: u verziji testa MLA C_M i C_V utvrđuju se kao umnožak ukupnog broja mikrojažica (TW) i vjerojatnog broja kolonija po jažici (P) na pločama s mikrojažicama.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Od nulte točke Poissonove distribucije (Furth et al., 1981.) P se određuje kao

$P = -\ln (EW / TW)$

Pri tom EW označava prazne jažice, a TW ukupne jažice. Zato je

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = CV / TV = (P_V \times TW_V) / T_V$

Kod verzije testa MLA s mikrojažicama učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama računat će se na isti način, upotrebom odgovarajućeg broja praznih jažica za male i velike kolonije.

Kod testa TK6 učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama temelji se na mutantima koji se javljaju rano i onima koji se javljaju kasno.

▼M8

B.68. **IN VITRO ISPITNA METODA S KRATKIM VREMENOM IZLAGANJA ZA UTVRĐIVANJE: i. KEMIKALIJA KOJE INDUCIRAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I ii. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 491 (2017.). *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja (STE) jest *in vitro* metoda koja se može upotrebljavati u određenim okolnostima i uz specifična ograničenja za razvrstavanje i označivanje kemikalija (tvari i smjese) koje induciraju tešku ozljedu oka s obzirom na opasnosti te onih za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) Europske unije ([1]).

2. Dulji niz godina potencijal opasnosti kemikalija za oko ocjenjivao se prvenstveno upotrebom *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5. (8.), ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 405). Opće je prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* ispitivanje na oku kunića neće moći potpuno zamijeniti nijednim alternativnim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za ispitivanje na oku kunića mogle bi se primjenjivati strateške kombinacije alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja (2.). Pristup odozgo prema dolje osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da imaju veliki potencijal za nadražujuće djelovanje ili da induciraju teške ozljede oka. Nasuprot tome, pristup odozdo prema gore osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da ne izazivaju dovoljno nadraživanje oka da bi ih se moralo razvrstati. Iako se ispitna metoda STE ne smatra potpunom zamjenom za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, primjerena je za upotrebu kao dio strategije višerazinskog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje, kao što je pristup odozgo prema dolje/odozdo prema gore, kako bi se bez daljnjeg ispitivanja utvrdile: i. kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i ii. kemikalije (pri čemu se isključuju vrlo hlapljive tvari i sve kemikalije u krutom stanju osim površinski aktivnih tvari) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) (1. i 2.). Međutim, kemikalija za koju se ispitnom metodom STE ne predvidi ni da inducira tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) ni da je bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u (ne inducira ni teške ozljede oka ni nadraživanje oka) morala bi se dodatno ispitati kako bi se utvrdilo konačno razvrstavanje. Nadalje, prije primjene ispitne metode STE u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima. Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (14.).

3. Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u ispitnoj metodi s kratkim vremenom

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

▼M8

izlaganja. Citotoksični učinak kemikalija na epitelne stanice rožnice važan je način djelovanja (MOA) koji dovodi do oštećenja epitela rožnice i nadraživanja oka. Vijabilnost stanica u ispitnoj metodi STE procjenjuje se kvantitativnim mjerenjem nakon što se iz stanica ekstrahira sol plavog formazana koju proizvode žive stanice enzimskom konverzijom vitalne boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), poznate i kao tiazolil plavo tetrazolijev bromid (3.). Dobivena vijabilnost stanica uspoređuje se s kontrolom s otapalom (relativna vijabilnost) i upotrebljava za procjenu potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko. Ispitivana kemikalija razvrstava se u kategoriju 1. sustava UN GHS-a/CLP-a ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica od 70 % ili manjom (≤). Nasuprot tome, predviđa se da je kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica većom od (>) 70 %.

4. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa. Definicije su navedene u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Ova se ispitna metoda temelji na protokolu koji je razvilo društvo Kao Corporation (4.) i koji je bio predmet dviju različitih validacijskih studija: jednu je proveo Validacijski odbor JSAAE-a (Japansko društvo za alternative pokusima na životinjama) (5.), a drugu JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda) (6.). Stručnu reviziju proveo je NICEATM/ICCVAM na temelju izvješća validacijskih studija i osnovnih dokumenata za preispitivanje o ispitnoj metodi (7).

6. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje induciraju teške ozljede oka (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u (1.), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 125 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 83 % (104/125), udio lažno pozitivnih rezultata od 1 % (1/86) i udio lažno negativnih rezultata od 51 % (20/39) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Dobiveni udio lažno negativnih rezultata nije presudan u ovom kontekstu jer bi se sve ispitivane kemikalije koje induciraju vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentraciji od 5 % i > 70 % pri koncentraciji od 0,05 % kasnije ispitale drugim primjereno validiranim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija, *in vivo* ispitivanjem na oku kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima i u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja i pristupima snage dokaza koji se sada preporučuju (1. i 8.). Uglavnom su ispitane tvari s jednim sastojkom, iako postoji ograničena količina podataka i o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Kod ispitne metode STE nisu uočeni nikakvi drugi specifični nedostaci kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a. Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode na ispitivanim kemikalijama, pri čemu bi vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentracijama od 5 % i 0,05 % trebalo prihvatiti kao pokazatelj odgovora da kemikalija inducira tešku ozljedu oka i da bi je bez daljnjeg ispitivanja trebalo razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a.

▼**M8**

7. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja i teške ozljede oka (tj. bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 130 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 85 % (110/130), udio lažno pozitivnih rezultata od 12 % (9/73) i udio lažno negativnih rezultata od 19 % (11/57) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Ako se iz skupa podataka isključe vrlo hlapljive tvari i krute tvari osim površinski aktivnih tvari, ukupna točnost poboljšava se na 90 % (92/102), udio lažno negativnih rezultata na 2 % (1/54), a udio lažno pozitivnih rezultata na 19 % (9/48) (7.). Kao posljedica, potencijalni nedostaci ispitne metode STE, kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja i teških ozljeda oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), uključuju visok udio lažno negativnih rezultata za: i. vrlo hlapljive tvari s tlakom pare većim od 6 kPa i ii. kemikalije u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari. Te kemikalije isključene su iz područja primjene ispitne metode STE (7.).

8. Uz kemikalije navedene u stavcima 6. i 7., skup podataka dobiven ispitnom metodom STE sadržava i interne podatke o 40 smjesa, koji su nakon što ih se usporedilo s *in vivo* Draizeovim ispitivanjem na oku pokazali točnost od 88 % (35/40), udio lažno pozitivnih rezultata od 50 % (5/10) i udio lažno negativnih rezultata od 0 % (0/30) u pogledu smjesa za koje nije potrebno razvrstavanje na temelju sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (9.). Ispitna metoda STE stoga se može primjenjivati za utvrđivanje smjesa bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u u pristupu odozdo prema gore, uz iznimku smjesa u krutom stanju osim onih koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari, kao proširenje njezina ograničenja na tvari u krutom stanju. Nadalje, smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.

9. Ispitna metoda STE ne može se upotrebljavati za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u ili kategorije 2.A (nadraživanje oka) ili 2.B (blago nadraživanje oka) prema sustavu UN GHS zbog znatnog broja kemikalija iz kategorije 1. prema GHS-u UN-a koje se preblago predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B te kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u koje se prestrogo predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B (7.). U tu svrhu može biti potrebno daljnje ispitivanje drugom prikladnom metodom.

10. Ispitna metoda STE primjerena je za ispitivane kemikalije koje se otapaju ili ravnomjerno suspendiraju najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Ispitna metoda STE nije primjerena za ispitivane kemikalije koje nisu topljive ili se ne mogu ravnomjerno suspendirati najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Upotreba mineralnog ulja u ispitnoj metodi STE moguća je zbog kratkotrajnog izlaganja. Stoga je ispitna metoda STE primjerena za predviđanje potencijala opasnosti ispitivanih kemikalija netopivih u vodi za oko (npr. dugolančani masni alkoholi ili ketoni) pod uvjetom da se mogu miješati u najmanje jednom od tri prethodno predložena otapala (4).

▼M8

11. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje ([1]) te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitna metoda STE *in vitro* je test koji se temelji na citotoksičnosti, a provodi se na konfluentnom monosloju stanica rožnice kunića Statens Serum Instituta (SIRC), koje se uzgajaju na polikarbonatnoj mikroploči s 96 jažica (4.). Nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji citotoksičnost se kvantitativno mjeri kao relativna vijabilnost stanica SIRC upotrebom MTT testa (4.). Smanjena vijabilnost stanica upotrebljava se za predviđanje potencijalnih štetnih učinaka koji dovode do oštećenja oka.

13. Navedeno je da se 80 % otopine koja se nakapa u oko kunića izluči preko konjunktivalne vrećice u roku od tri do četiri minute, dok se više od 80 % otopine koja se nakapa u ljudsko oko izluči u roku od jedne do dvije minute (10.). Ispitnom metodom STE pokušavaju se uskladiti ta vremena izlaganja te se citotoksičnost upotrebljava kao krajnja točka za procjenu razmjera oštećenja stanica SIRC nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

14. Prije rutinske upotrebe ispitne metode STE opisane u ovoj ispitnoj metodi laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost točnim utvrđivanjem kategorije jedanaest tvari koje su preporučene u tablici 1. Te su tvari odabrane kako bi predstavljale cijeli raspon odgovora za ozbiljnu ozljedu oka ili nadraživanje oka na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica za ispitivanje 405) i sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (1.). Među ostalim su kriterijima za odabir: tvari bi trebale biti komercijalno dostupne, trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vitro* podaci iz ispitne metode STE (3.). U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji kao ovdje opisani kriteriji.

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	*In vivo* kat. sustava UN GHS ili CLP-a ([2])	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
Benzalkonijev klorid (10 %, vodena otopina)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekuće	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Tekuće	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.

([1]) U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim ispitnim metodama sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje kada je to moguće.

▼**M8**

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	*In vivo* kat. sustava UN GHS ili CLP-a ([2])	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
Kiselo crvena 92	18472-87-2	Heterociklički spoj; spoj broma; spoj klora	Kruto	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Lužina; anorganska kemikalija	Kruto	Kategorija 1. ([3])	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Butirolakton	96-48-0	Lakton; heterociklički spoj	Tekuće	Kategorija 2.A (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Tekuće	Kategorija 2.A/B ([4]) (kategorija 2. prema CLP-u)	Mineralno ulje	Predviđanje nije moguće
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; ugljikovodik, ciklički	Tekuće	Kategorija 2.A/B ([5]) (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
2-etoksietilacetat	111-15-9	Alkohol; eter	Tekuće	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije
Dodekan	112-40-3	Ugljikovodik, aciklički	Tekuće	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Tekuće	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije

▼M8

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	*In vivo* kat. sustava UN GHS ili CLP-a ([2])	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
1,1-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	Amidin; spoj sumpora	Kruto	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije

([1]) Kemijski razredi dodijeljeni su upotrebom informacija iz prethodnih publikacija NICEATM-a, a ako one nisu dostupne, upotrebom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH®) (putem baze podataka ChemID-plus® (Nacionalna medicinska knjižnica), dostupno na http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) i NICEATM-ovih određenja strukture.

([2]) Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) i uz primjenu sustava UN GHS/CLP-a (1.).

([3]) Razvrstavanje u kategoriju 1. temelji se na potencijalu 100-postotnog natrijeva hidroksida da nagrize kožu (naveden kao kemikalija za dokazivanje osposobljenosti s potencijalom nagrizanja kože u Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) i kriteriju za kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a (1.).

([4]) Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da dvije od šest životinja ili četiri od šest životinja imaju učinke sedmog dana. *In vivo* skup podataka uključivao je dvije studije s tri životinje u svakoj. U jednoj studiji dvije od tri životinje sedmog su dana pokazale učinke koji zahtijevaju razvrstavanje u kategoriju 2.A (11.), dok su u drugoj studiji sve krajnje točke kod sve tri životinje ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana, što zahtijeva razvrstavanje u kategoriju 2.B (12.).

([5]) Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice i crvenila konjunktive kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 i crvenila konjunktive 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila 14. dana (11.).

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

POSTUPAK

Priprema staničnog monosloja

15. Za provođenje ispitne metode STE treba upotrebljavati SIRC, staničnu liniju rožnice kunića. Preporučuje se da se stanice SIRC nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection CCL60.

16. Stanice SIRC uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uvjetima u tikvici s kulturom koja sadržava medij za uzgoj kulture koji se sastoji od Eagleova minimalnog esencijalnog medija (MEM) obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 jedinica/ml penicilina i 50–100 μg/ml streptomicina. Stanice koje su postale konfluentne u tikvici s kulturom treba izdvojiti upotrebom otopine tripsin etilendiamintetraoctene kiseline, uz upotrebu pribora za struganje stanica ili bez njega. Stanice se razmnožavaju (npr. od dvije do tri pasaže) u tikvici s kulturom prije nego što se upotrijebe za rutinsko ispitivanje te se od odmrzavanja trebaju pasažirati najviše 25 puta.

17. Stanice koje su spremne za upotrebu u testu STE zatim se pripremaju u odgovarajućoj gustoći te se nasađuju u ploče s 96 jažica. Preporučuje se gustoća nasađivanja stanica od $6{,}0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju četiri dana nakon nasađivanja ili $3{,}0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju pet dana nakon nasađivanja, pri volumenu kulture od 200 μl. Stanice koje se upotrebljavaju za test STE i koje se nasade u medij za uzgoj kulture pri odgovarajućoj gustoći dosegnut će konfluenciju od više od 80 % u vrijeme ispitivanja, tj. četiri ili pet dana nakon nasađivanja.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

18. Fiziološka otopina prvi je odabir za otapalo za otapanje ili suspendiranje ispitivanih kemikalija. Ako ispitivana kemikalija pokazuje slabu topljivost ili se u najmanje pet minuta ne može ravnomjerno otopiti ili suspendirati

▼M8

u fiziološkoj otopini, kao drugi izbor za otapalo upotrebljava se 5-postotni DMSO (CAS br. 67-68-5) u fiziološkoj otopini. Kod ispitivanih kemikalija koje se u najmanje pet minuta ne mogu ravnomjerno otopiti ili suspendirati u fiziološkoj otopini ili 5-postotnom DMSO-u u fiziološkoj otopini, kao treći izbor za otapalo upotrebljava se mineralno ulje (CAS br. 8042-47-5) u fiziološkoj otopini.

19. Ispitivane kemikalije ravnomjerno se otapaju ili suspendiraju u odabranom otapalu pri koncentraciji od 5 % (w/w) i dodatno razrjeđuju serijskim deseterostrukim razrjeđivanjem do koncentracije od 0,5 % i 0,05 %. Svaka se kemikalija mora ispitati i pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %. Stanice koje se uzgajaju na ploči s 96 jažica izlažu se dozi od 200 µl/jažica otopine (ili suspenzije) ispitivane kemikalije u koncentraciji od 5 % ili 0,05 % na pet minuta na sobnoj temperaturi. Ispitivane kemikalije (tvari s jednim sastojkom ili tvari s više sastojaka ili smjese) smatraju se čistim tvarima i razrjeđuju se ili suspendiraju u skladu s metodom, neovisno o njihovoj čistoći.

20. Medij za uzgoj kulture opisan u stavku 16. upotrebljava se kao kontrola s medijem na svakoj ploči svakog ponavljanja. Nadalje, stanice se izlažu i uzorcima kontrole s otapalom na svakoj ploči svakog ponavljanja. Za otapala navedena u stavku 18. potvrđeno je da ne utječu štetno na vijabilnost stanica SIRC.

21. Kod ispitne metode STE kao pozitivna kontrola na svakoj ploči svakog ponavljanja upotrebljava se 0,01-postotni natrijev lauril sulfat (SLS) u fiziološkoj otopini. Kako bi se izračunala vijabilnost stanica pozitivne kontrole, svaka ploča svakog ponavljanja mora uključivati i fiziološku otopinu kao kontrolu s otapalom.

22. Slijepa proba potrebna je kako bi se utvrdila kompenzacija za optičku gustoću i treba je provesti u jažicama koje sadržavaju samo fiziološku otopinu puferiranu fosfatnim puferom, ali ne kalcij i magnezij (PBS-) ni stanice.

23. Svaki uzorak (ispitivana kemikalija pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %, kontrola s medijem, kontrola s otapalom i pozitivna kontrola) treba ispitati triput za svako ponavljanje izlaganjem stanica dozi od 200 µl odgovarajuće ispitivane ili kontrolne kemikalije na pet minuta na sobnoj temperaturi.

24. Referentne tvari korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih kemikalija iz specifičnog kemijskog razreda ili razreda proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje tvari koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću tvar.

Mjerenje vijabilnosti stanica

25. Stanice se nakon izlaganja ispiru s 200 µl PBS-a i dodaje im se 200 µl otopine MTT-a (0,5 mg MTT/ml medija za uzgoj kulture). Nakon dvosatnog vremena reakcije u inkubatoru (37 °C, 5 % CO_2), otopina MTT-a pretače se, MTT formazan ekstrahira se tako da se doda 200 µl 0,04 N klorovodične kiseline i izopropanola tijekom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te se apsorbancija otopine MTT formazana mjeri pri 570 nm upotrebom čitača ploča. Ispitivane kemikalije utječu na MTT test (bojilima ili tvarima koje neposredno reduciraju MTT) samo ako se u ispitnom sustavu zadržava znatna količina ispitivane kemikalije nakon ispiranja koje se obavlja nakon izlaganja, a to je slučaj kod 3D tkiva rekonstruirane ljudske rožnice ili rekonstruirane ljudske epiderme, ali nije relevantno za 2D stanične kulture koje se upotrebljavaju za ispitnu metodu STE.

▼M8

Tumačenje rezultata i model predviđanja

26. Vrijednosti optičke gustoće (OD) za svaku ispitivanu kemikaliju zatim se upotrebljavaju za izračun vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu s otapalom, koja je određena kao 100 %. Relativna vijabilnost stanica izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća ispitivane kemikalije podijeli optičkom gustoćom kontrole s otapalom nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

$$Vijab.stanica(\%) = \frac{(OD_{570}\ ispit.kemikalije) - (OD_{570}\ slijepe\ probe)}{(OD_{570}\ kontr.s\ otapalom) - (OD_{570}\ slijepe\ probe)} \times 100$$

Slično tome, relativna vijabilnost stanica kod svake kontrole s otapalom izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća svake kontrole s otapalom podijeli optičkom gustoćom kontrole s medijem nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

27. Treba provesti tri neovisna ponavljanja s po tri jažice s ponavljanjem (tj. n = 9). Aritmetička sredina triju jažica za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolu s otapalom u svakom neovisnom ponavljanju upotrebljava se za izračun aritmetičke sredine relativne vijabilnosti stanica. Konačna aritmetička sredina vijabilnosti stanica računa se iz tri neovisna ponavljanja.

28. Granične vrijednosti vijabilnosti stanica za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i ispitivanih kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) navedene su u nastavku.

Tablica 2.

Model predviđanja ispitne metode STE

Vijabilnost stanica		Razvrstavanje prema sustavu GHS UN-a ili CLP-u	Primjenjivost
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Bez kategorije	Tvari i smjese uz iznimku: i. vrlo hlapljivih tvari s tlakom pare većim od 6 kPa ([1]); i ii. kemikalija u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari
≤ 70 %	> 70 %	Predviđanje nije moguće	Nije primjenjivo
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategorija 1.	Tvari i smjese ([2])

([1]) Smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.

([2]) Na temelju rezultata dobivenih uglavnom s tvarima s jednim sastojkom, iako postoji i ograničena količina podataka o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

▼M8

Kriteriji prihvatljivosti

29. Rezultati ispitivanja ocjenjuju se kao prihvatljivi ako su ispunjeni svi sljedeći kriteriji:

a) optička gustoća kontrole s medijem (izložene mediju za uzgoj kulture) treba biti 0,3 ili veća nakon što se oduzme optička gustoća slijepe probe;

b) vijabilnost kontrole s otapalom treba biti 80 % ili veća u odnosu na kontrolu s medijem. Ako se u svakom ponavljanju upotrebljava više kontrola s otapalom, svaka kontrola treba pokazivati vijabilnost stanica veću od 80 % kako bi se razvrstale ispitivane kemikalije koje se ispituju tim otapalima;

c) vijabilnost stanica koja se dobije s pozitivnom kontrolom (0,01 % SLS) treba biti u okviru dvije standardne devijacije prijašnje srednje vrijednosti. Gornju i donju granicu prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu treba često ažurirati, tj. svaka tri mjeseca ili svaki put kada se provodi prihvatljivi test u laboratorijima u kojima se testovi ne provode često (tj. rjeđe od jednom mjesečno). Ako laboratorij ne provede dovoljan broj pokusa kako bi se utvrdila statistički pouzdana distribucija pozitivnih kontrola, prihvatljiva je upotreba gornje i donje granice prihvatljivosti koju je utvrdio subjekt koji je razvio metodu, tj. od 21,1 % do 62,3 % prema prijašnjim podacima laboratorija, dok se interna distribucija izrađuje tijekom prvih rutinskih testova;

d) standardna devijacija konačne vijabilnosti stanica koja se dobije iz tri neovisna ponavljanja treba biti manja od 15 % i kod koncentracije od 5 % i od 0,05 % ispitivane kemikalije.

Ako nije ispunjen jedan ili više od tih kriterija, rezultate treba odbaciti i treba provesti još tri neovisna ponavljanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

30. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu jažicu (npr. vrijednosti vijabilnosti stanica) svakog ponavljanja te ukupnu srednju vrijednost, standardnu devijaciju i razvrstavanje.

Izvješće o ispitivanju

31. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari

— tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

▼**M8**

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Uvjeti i postupci ispitne metode

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljene ispitne metode,

— upotrijebljena stanična linija, njezin izvor, broj pasaže i konfluencija stanica koje se koriste za ispitivanje,

— pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku,

— broj primijenjenih ponavljanja i ponovljenih uzoraka,

— koncentracije ispitivane kemikalije (ako je drukčije od preporučenog),

— obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju,

— trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji (ako je drukčije od preporučenog),

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— upućivanje na prijašnju srednju vrijednost pozitivne kontrole i standardno odstupanje,

— dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tijekom vremena.

Rezultati

— za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar te svaku ispitanu koncentraciju treba navesti tablični prikaz za pojedinačne vrijednosti optičke gustoće po jažici ponovljenog uzorka, aritmetičke srednje vrijednosti optičke gustoće za svako neovisno ponavljanje, postotak vijabilnosti stanica za svako neovisno ponavljanje i konačnu aritmetičku sredinu postotka vijabilnosti stanica i standardnu devijaciju u tri ponavljanja,

— rezultati za kontrolu s medijem, kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu kojima se dokazuju odgovarajući kriteriji prihvatljivosti istraživanja,

— opis drugih uočenih učinaka,

— ukupno utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

▼M8

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York! & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2. Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.

3. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.

4. Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760.–770.

5. Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796.–809.

6. Kojima H, *et al*. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855.–1869.

7. ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupno na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

8. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje oka.

9. Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

10. Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci. 1648.–1653.

11. ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruxelles, Belgija.

12. Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl Toxicol. 18, 442.–449.

13. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

14. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (13.).

Referentna tvar: tvar koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna tvar trebala bi imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci i v. poznatu snagu u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Nadraživanje oka: promjena na oku nastala kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koja je potpuno reverzibilna u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

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

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

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

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

▼M8

OD: optička gustoća.

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

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (10.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (13.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (10.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdio polazni odgovor za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (13.).

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

Površinski aktivna tvar: kemikalija, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, a kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje.

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

▼M8

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ispitivanoj kemikaliji ne može pripisati potencijal za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevitog sekvencijskog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjevit pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da uzrokuje tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

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

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS: kemikalije koje nisu razvrstane u kategoriju 1. ili 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u, (ili kategoriju 2.A ili 2.B prema sustavu UN GHS).

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

▼M8

B.69. **ISPITNA METODA REKONSTRUIRANOG EPITELA KOJI NALIKUJE LJUDSKOJ ROŽNICI (RhCE) ZA UTVRĐIVANJE KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 492 (2017.). *Teška ozljeda oka* odnosi se na izazivanje oštećenja tkiva oka ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, a koje nije potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ([1]) Europske unije. Prema sustavu UN GHS i CLP-u *nadraživanje oka* odnosi se na izazivanje promjena u oku nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su u potpunosti reverzibilne unutar 21 dana nakon primjene. Ispitivane kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka razvrstane su u kategoriju 1. sustava UN GHS i CLP-a, dok su kemikalije koje induciraju nadraživanje oka razvrstane u kategoriju 2. sustava UN GHS i CLP-a. Ispitivane kemikalije koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka definirane su kao one koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS i CLP-a, odnosno one se navode kao kemikalije bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u.

2. Procjena teške ozljede oka/nadraživanja oka obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.5. (2.)). Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (39.).

3. U ovoj ispitnoj metodi opisuje se *in vitro* postupak koji omogućuje utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om. U njoj se upotrebljava rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici (RhCE) i koji vjerno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva epitela ljudske rožnice. Validirane su još četiri *in vitro* ispitne metode koje se smatraju znanstveno valjanima te su donesene kao ispitne metode B.47. (3.), B.48. (4.), B.61. (5.) i B.68. (6.), a bave se krajnjom točkom teške ozljede oka/nadraživanja oka na zdravlje ljudi.

4. Ova ispitna metoda obuhvaća dva validirana testa u kojima se upotrebljavaju komercijalno dostupni modeli RhCE-a. Validacijske studije za procjenu nadraživanja oka/teške ozljede oka provedene su (7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.) upotrebom testa nadraživanja oka (EIT) EpiOcular™ (EIT) i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™. U svakom od tih testova kao ispitni sustav upotrebljavaju se komercijalno dostupni modeli tkiva RhCE, koje se dalje u tekstu navode kao validirane referentne metode VRM1 i VRM2. Iz tih validacijskih studija i njihovih neovisnih stručnih pregleda (9. i 12.) donesen je zaključak da se

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

▼M8

testom nadraživanja oka EpiOcular™ i testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu točno utvrditi kemikalije (i tvari i smjese) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS te su testovi preporučeni kao znanstveno valjani za tu svrhu (13.).

5. Trenutačno je opće prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku kunića (2. i 14.) neće moći potpuno zamijeniti nijednom pojedinačnom *in vitro* ispitnom metodom za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategija (višerazinskog) ispitivanja, kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje (15.). Pristup odozdo prema gore (15.) trebalo bi primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da kemikalija neće izazvati znatno nadraživanje oka koje bi zahtijevalo razvrstavanje, dok bi pristup odozgo prema dolje (15.) trebalo primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će kemikalija izazvati tešku ozljedu oka. Test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ preporučuju se za utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) bez daljnjeg ispitivanja, u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje koju su predložili Scott i dr., npr. kao početni korak u pristupu odozdo prema gore ili kao jedan od posljednjih koraka u pristupu odozgo prema dolje (15.). Međutim, test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ nisu namijenjeni za razlikovanje kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a (teška ozljeda oka) od kategorije 2. tog sustava (nadraživanje oka). Ta razlika morat će se utvrditi na drugoj razini strategije ispitivanja (15.). Ispitivanu kemikaliju za koju se testom nadraživanja oka EpiOcular™ ili testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ utvrdi da ju je potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja oka/teške ozljede oka stoga će trebati dodatno ispitati (*in vitro* i/ili *in vivo*) kako bi se došlo do konačnog zaključka (bez kategorije, kategorija 2. ili kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u), npr. upotrebom ispitne metode B.47., B.48., B.61. ili B.68.

6. Svrha je ove ispitne metode opisati postupak koji se primjenjuje za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u modelu tkiva RhCE, kako se izmjeri MTT testom (16.) (vidjeti stavak 21.). Vijabilnost tkiva RhCE nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji utvrđuje se u usporedbi s tkivima koja se tretiraju s tvari za negativnu kontrolu (postotak vijabilnosti) i zatim se upotrebljava za predviđanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko.

7. Za lakšu validaciju novih ili izmijenjenih *in vitro* testova koji se temelje na RhCE-u i koji su slični testu nadraživanja oka EpiOcular™ i testu nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ dostupni su zahtjevi izvedbe (17.), u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (18.) te oni omogućuju pravovremenu izmjenu Smjernice OECD-a za ispitivanje 492 radi uključivanja tih načela. Uzajamno prihvaćanje podataka na temelju sporazuma OECD-a jamči se samo za testove koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao te testove i uključio ih u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

8. Definicije su navedene u Dodatku 1.

▼**M8**

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

9. Ova ispitna metoda temelji se na komercijalnim trodimenzionalnim modelima tkiva RhCE koji se proizvode upotrebom primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita (tj. EpiOcular™ OCL-200) ili ljudskih imortaliziranih epitelnih stanica rožnice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Modeli tkiva RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S slični su *in vivo* trodimenzionalnoj strukturi epitela rožnice i proizvode se upotrebom stanica vrste koja se proučava (19. i 20.). Nadalje, testovima se izravno mjeri citotoksičnost koja je rezultat prolaska kemikalije kroz rožnicu i izazivanja oštećenja stanica i tkiva; citotoksični odgovor zatim određuje ukupni ishod *in vivo* teške ozljede oka/nadraženosti oka. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja (vidjeti stavak 20.), ali citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, koja se *in vivo* uglavnom očituje u pojavi zamućenja rožnice, iritisa, crvenila konjunktive i/ili kemoze konjunktive, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva.

10. U validacijskoj studiji na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, koje obuhvaćaju vrlo različite vrste kemikalija, kemijske razrede, molekularne mase, vrijednosti LogP, kemijske strukture itd. Validacijska baza podataka za test nadraživanja oka EpiOcular™ sadržavala je ukupno 113 kemikalija, koje su obuhvaćale 95 različitih organskih funkcionalnih skupina u skladu s analizom OECD-ova alata QSAR (8.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući tri homopolimera, pet kopolimera i deset kvazipolimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 113 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 13 tekućina iz kategorije 1., 15 kemikalija u krutom stanju iz kategorije 1., šest tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, sedam tekućina iz kategorije 2.B, sedam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 27 tekućina bez kategorije i 28 kemikalija u krutom stanju bez kategorije (8.). Validacijska baza podataka za test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ sadržavala je ukupno 200 kemikalija, koje su obuhvaćale 165 različitih organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući deset polimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 200 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 27 tekućina iz kategorije 1., 24 kemikalije u krutom stanju iz kategorije 1., 19 tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, devet tekućina iz kategorije 2.B, osam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 50 tekućina bez kategorije i 53 kemikalije u krutom stanju bez kategorije (10. i 11.).

11. Ova je ispitna metoda primjenjiva na tvari i smjese te na kemikalije u krutom stanju, tekućine, polukrute kemikalije i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebna nikakva druga prethodna obrada uzorka. Plinovi i aerosoli nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhCE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

12. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu utjecati na mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za kvantificiranje MTT formazana (vidjeti stavke 36.–42.).

▼**M8**

13. Rezultati dobiveni u predvalidacijskoj (21. i 22.) i cjelokupnoj validacijskoj (8., 10. i 11.) studiji pokazali su da se i test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu prenijeti u laboratorije koji još nikada nisu provodili te testove te da su obnovljivi unutar jednog laboratorija i između više laboratorija. Na temelju tih studija razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka EpiOcular™ na temelju podataka o 113 kemikalija iznosi približno 95 % unutar laboratorija i 93 % između više laboratorija. Razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ na temelju podataka o 120 kemikalija iznosi približno 92 % unutar laboratorija i 95 % između više laboratorija.

14. Test nadraživanja oka EpiOcular™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (8.), test nadraživanja oka EpiOcular™ ima ukupnu točnost od 80 % (na temelju 112 kemikalija), osjetljivost od 96 % (na temelju 57 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 4 % (na temelju 57 kemikalija), specifičnost od 63 % (na temelju 55 kemikalija) i udio lažno pozitivnih rezultata od 37 % (na temelju 55 kemikalija), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Studija u kojoj je 97 tekućih agrokemijskih formulacija ispitano testom nadraživanja oka EpiOcular™ pokazala je sličnu uspješnost ispitne metode za tu vrstu smjesa kao što je ona dobivena u validacijskoj studiji (23.). Tih je 97 formulacija distribuirano na sljedeći način: 21 kemikalija iz kategorije 1., 19 kemikalija iz kategorije 2.A, 14 kemikalija iz kategorije 2.B i 43 kemikalije bez kategorije, razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS na temelju referentnih podataka *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.). Dobivena je ukupna točnost od 82 % (na temelju 97 formulacija), osjetljivost od 91 % (na temelju 54 formulacije), udio lažno negativnih rezultata od 9 % (na temelju 54 formulacije), specifičnost od 72 % (na temelju 43 formulacije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 43 formulacije) (23.).

15. Test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (10. i 11.), test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ ima ukupnu točnost od 84 % (na temelju 200 kemikalija), osjetljivost od 95 % (na temelju 97 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 5 % (na temelju 97 kemikalija), specifičnost od 72 % (na temelju 103 kemikalije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 103 kemikalije), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om.

16. Udjeli lažno negativnih rezultata dobiveni u oba testa RhCE, s tvarima ili smjesama, ulaze u 12-postotnu ukupnu vjerojatnost da se kemikalije u *in vivo* Draizeovu ispitivanju na oku u ponovljenim testovima utvrde kao kemikalije iz kategorije 2. ili bez kategorije u skladu sa sustavom UN GHS ili CLP-om; uzrok je tomu inherentna varijabilnost unutar testa u toj metodi (24.). Stope lažno negativnih rezultata dobivene u obje ispitne metode RhCE s tvarima ili smjesama nisu presudne u kontekstu ove ispitne metode jer je sve ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost tkiva jednaka utvrđenim graničnim vrijednostima ili manja od njih (vidjeti stavak 44.) potrebno dodatno ispitati drugim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija kod kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima, upotrebom strategije sekvencijskog ispitivanja u analizi snage dokaza. Ove se ispitne metode mogu primjenjivati za sve vrste kemikalija, pri čemu negativni rezultat treba biti prihvatljiv za nerazvrstavanje kemikalije s obzirom na nadraživanje

▼M8

oka i tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u). Prije primjene testa nadraživanja oka EpiOcular™ i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima.

17. Ograničenje je ove ispitne metode to što ne omogućuje razlikovanje nadraživanja oka/reverzibilnih učinaka na oko (kategorija 2.) od teške ozljede oka/ireverzibilnih učinaka na oko (kategorija 1.), kako je utvrđeno sustavom UN GHS i CLP-om, niti razlikovanje kemikalija nadražujućih za oči (neobvezna kategorija 2.A) od kemikalija blago nadražujućih za oči (neobavezna kategorija 2.B), kako je utvrđeno sustavom UN GHS (1.). U te je svrhe potrebno daljnje ispitivanje drugim *in vitro* ispitnim metodama.

18. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija" upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje ([1]) te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode RhCE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

19. Ispitivana kemikalija lokalno se nanosi na najmanje dva trodimenzionalna modela tkiva RhCE, a vijabilnost tkiva mjeri se nakon izlaganja i razdoblja inkubacije nakon tretiranja. Tkiva RhCE rekonstruiraju se iz primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita ili ljudskih imortaliziranih epitelnih stanica rožnice, koje su uzgajane nekoliko dana kako bi tvorile stratificirani, visoko izdiferencirani ljuskavi epitel koji je morfološki sličan onom koji se nalazi u ljudskoj rožnici. Model tkiva EpiOcular™ RhCE sastoji se od najmanje tri vijabilna sloja stanica i nekeratinizirane površine, koji imaju strukturu koja nalikuje rožnici i analogna je strukturi *in vivo*. Model tkiva SkinEthic™ HCE RhCE sastoji se od najmanje četiri vijabilna sloja stanica, uključujući stupičaste bazalne stanice, prijelazne krilate stanice i površinske ljuskave stanice koje su slične uobičajenom epitelu ljudske rožnice (20. i 26.).

20. Kemijski inducirana teška ozljeda oka/nadraživanje oka, koji se *in vivo* uglavnom očituju kao zamućenje rožnice, iritis, crvenilo konjunktive i/ili kemoza konjunktive, rezultat je niza događaja koji započinju prodiranjem kemikalije kroz rožnicu i/ili konjunktivu i oštećenjem stanica. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja, uključujući: liziranje stanične membrane (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima); koagulaciju makromolekula (osobito proteina) (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima, lužinama i kiselinama); saponifikaciju lipida (npr. lužinama); i alkilaciju ili druge kovalentne interakcije s makromolekulama (npr. izbjeljivačima, peroksidima i alkilatorima) (15., 27. i 28.). Međutim, pokazalo se da citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva (29. i 30.). Nadalje, potencijal kemikalije da izazove tešku ozljedu oka/nadraživanje oka prvenstveno je određen razmjerom početne ozljede (31.), koji je u korelaciji s razmjerom smrti stanica (29.) i s razmjerom naknadnih odgovora i konačnih ishoda (32.). Stoga slabo nadražujuće kemikalije obično utječu samo na površinski

([1]) U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija" kojim se opisuje ono što se ispituje.

▼M8

epitel rožnice, blago i umjereno nadražujuće kemikalije uglavnom oštećuju epitel i površinsku stromu, a jako nadražujuće kemikalije oštećuju epitel, dubinsku stromu, a ponekad i endotel rožnice (30. i 33.). Mjerenje vijabilnosti modela tkiva RhCE nakon lokalnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji radi utvrđivanja kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na tešku ozljedu oka/nadraživanje oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) temelji se na pretpostavci da će sve kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka inducirati citotoksičnost u epitelu rožnice i/ili konjunktivi.

21. Vijabilnost tkiva u modelima RhCE obično se mjeri enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1], koju vrše vijabilne stanice tkiva, u sol plavog MTT formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (16.). Kemikalije koje ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) utvrđene su kao kemikalije koje ne smanjuju vijabilnost tkiva ispod utvrđenog praga (tj. vijabilnost tkiva > 60 % u testu EIT EpiOcular™ i testu EITL ([1]) s HCE-om SkinEthic™ ili > 50 % u testu EITS ([2]) s HCE-om SkinEthic™) (vidjeti stavak 44.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

22. Prije rutinske upotrebe testova RhCE u regulatorne svrhe laboratoriji trebaju dokazati tehničku osposobljenost tako da točno predvide 15 kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 1. Te su kemikalije odabrane među kemikalijama upotrijebljenima u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda (8., 10. i 11.). Odabir uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, kemikalije: i. koje obuhvaćaju različita agregatna stanja; ii. koje obuhvaćaju puni raspon odgovora u obliku *in vivo* teške ozljede oka/nadraživanja oka na temelju visokokvalitetnih rezultata dobivenih u referentnom *in vivo* ispitivanju na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.) te prema sustavu razvrstavanja UN GHS (tj. kategorije 1., 2.A, 2.B ili bez kategorije) (1.) i CLP-u (tj. kategorije 1., 2. ili bez kategorije); iii. koje obuhvaćaju različite *in vivo* pokretače razvrstavanja (24. i 25.); iv. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskoj studiji (8., 10. i 11.); v. koje obuhvaćaju dobru i široku zastupljenost organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.); vi. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture (8., 10. i 11.); vii. koje su obojene i/ili koje izravno reduciraju MTT; viii. koje su dale ponovljive rezultate u ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacija; ix. koje su točno predviđene ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacijskih studija; x. koje obuhvaćaju puni raspon *in vitro* odgovora na temelju visokokvalitetnih podataka iz ispitnih metoda RhCE (vijabilnost od 0 do 100 %); xi. koje su komercijalno dostupne; i xii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima nabave i/ili zbrinjavanja. U situacijama kada navedena kemikalija nije dostupna ili se ne može upotrijebiti iz drugih opravdanih razloga, mogla bi se upotrijebiti druga kemikalija koja ispunjava prethodno opisane kriterije, npr. kemikalije koje su upotrijebljene u validaciji validirane referentne metode. Međutim, takva odstupanja treba obrazložiti.

([1]) EITL: test nadraživanja oka (EIT) za tekućine s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.

([2]) EITS: test nadraživanja oka (EIT) za kemikalije u krutom stanju s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.

▼M8

Tablica 1.

Popis kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina (1)	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) (2)	Vijabilnost za VRM2 (%) (3)	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
***In vivo* kategorija 1.** (4)								
Metil-tioglikolat	2365-48-2	Ester karboksilne kiseline; tioalkohol	Tekuće	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Predviđanje nije moguće	Da (jako)	Ne
Hidroksietil-akrilat	818-61-1	Akrilat; alkohol	Tekuće	7,5 ± 4,7 (5)	1,6 ± 1,0	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	Alkohol	Kruto	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
Natrijev oksalat	62-76-0	Okso-karboksilna kiselina	Kruto	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
In vivo kategorija 2.A (4)								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N″-bis(4-klorfenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodena otopina) (6)	18472-51-0	Aromatski heterociklički halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	Tekuće	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Predviđanje nije moguće	Ne	Da (slabo)
Natrijev benzoat	532-32-1	Aril; karboksilna kiselina	Kruto	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
***In vivo* kategorija 2.B** (4)								
Dietiltoluamid	134-62-3	Benzamid	Tekuće	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, razgranat tercijarnim ugljikom; alken; bicikloheptan; karbociklički spojevi s premoštenim prstenastim sustavom; cikloalkan	Kruto	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
***In vivo* bez kategorije** (4)								
1-etil-3-metilimidazolium etilsulfat	342573-75-5	Alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	Tekuće	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Bez kat.	Ne	Ne

▼M8

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ([1])	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ([2])	Vijabilnost za VRM2 (%) ([3])	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
Dikaprilil eter	629-82-3	Alkoksi; eter	Tekuće	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Bez kat.	Ne	Ne
Piperonil butoksid	51-03-6	Alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	Tekuće	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Bez kat.	Ne	Ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogeniranog ricinusovog ulja	61788-85-0	Acilal; alkohol; alil; eter	Viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Bez kat.	Ne	Ne
1-(4-klorfenil)-3-(3,4-diklorfenil) urea	101-20-2	Aromatski heterociklički halid; aril halid; derivati uree	Kruto	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Bez kat.	Ne	Ne
2,2′-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol)	103597-45-1	Alkan razgranat kvarternim ugljikom; vezani karbociklički aromatski spoj; vezani zasićeni heterociklički spojevi; prekursori kinoidnih spojeva; tert-butil	Kruto	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Bez kat.	Ne	Ne
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganska sol	Kruto	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Bez kat.	Ne	Ne

Kratice:

CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; UN GHS = Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (1.); VRM1 = validirana referentna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referentna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Interferencija s bojom = interferencija s bojom kod mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) MTT formazana.

([1]) Organska funkcionalna skupina dodijeljena u skladu s ugniježđenom analizom OECD-ova alata 3.1. (8.).

([2]) Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja oka EpiOcular™ u validacijskoj studiji nadraživanja oka (EIVS) EURL ECVAM-a/udruženja Cosmetics Europe (8.).

([3]) Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u validacijskoj studiji (10. i 11.).

([4]) Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5./Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) (2. i 14.) i uz primjenu sustava UN GHS.

([5]) Na temelju rezultata dobivenih u konzorciju CEFIC za studiju o strategiji *in vitro* ispitivanja nadraživanja oka (CON4EI).

([6]) Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila devetog dana.

23. U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela tkiva RhCE (vidjeti stavke 25., 27. i 30.) To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se ispitivanje uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njegove upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitivanja preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim razmacima.

▼M8

POSTUPAK

24. Ovom ispitnom metodom trenutačno su obuhvaćeni znanstveno valjani test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ (9., 12. i 13.), koji se nazivaju validirane referentne metode (VRM1 i VRM2). Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za ispitnu metodu RhCE te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi i primjeni ispitnih metoda u laboratoriju (34. i 35.). U sljedećim stavcima i Dodatku 2. opisuju se glavni elementi i postupci testova RhCE.

ELEMENTI ISPITNE METODE RHCE

Opći uvjeti

25. Treba upotrebljavati relevantne ljudske stanice za rekonstrukciju trodimenzionalnog tkiva epitela koje nalikuje rožnici, a koje bi se trebalo sastojati od progresivno stratificiranih, ali ne i kornificiranih stanica. Model tkiva RhCE priprema se u umetcima s poroznom sintetičkom membranom kroz koju hranjive tvari mogu proći do stanica. U rekonstruiranom epitelu koji nalikuje rožnici trebaju biti prisutni višestruki slojevi vijabilnih, nekeratiniziranih stanica epitela. Model tkiva RhCE trebao bi imati površinu epitela koja je u izravnom dodiru sa zrakom kako bi se omogućilo izravno lokalno izlaganje ispitivanim kemikalijama na način koji je sličan načinu na koji bi epitel rožnice bio izložen *in vivo*. Model tkiva RhCE treba činiti funkcionalnu barijeru koja je dovoljno otporna da zaustavi brzi prodor citotoksičnih referentnih tvari, npr. Tritona X-100 ili natrijeva dodecil-sulfata (SDS). Treba dokazati funkciju barijere, a ona se može ocijeniti utvrđivanjem ili vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % (ET_{50}) nakon primjene referentne tvari u utvrđenoj, fiksnoj koncentraciji (npr. 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100) ili koncentracije pri kojoj referentna tvar smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC_{50}) nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a) (vidjeti stavak 30.). Model tkiva RhCE treba biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak ispitivane kemikalije oko ruba vijabilnog tkiva, jer bi to moglo značiti loše modeliranje izlaganja rožnice. Ljudske stanice koje se upotrebljavaju za utvrđivanje modela tkiva RhCE ne smiju biti onečišćene bakterijama, virusima, mikoplazmom i gljivicama. Dobavljač treba provjeriti je li model tkiva sterilan i utvrditi da nema kontaminacije gljivicama i bakterijama.

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

26. Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (16.). Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala, tj. OD < 0,1. Korisnici modela tkiva RhCE trebali bi osigurati da svaka šarža modela tkiva RhCE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za validirane referentne metode navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. U ispitnom izvješću potrebno je dokumentirati da su tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu stabilna u kulturi (daju slična mjerenja vijabilnosti tkiva) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja. Proizvođač tkiva trebao bi slijediti isti postupak kao dio kontrole kvalitete šarže tkiva, ali u tom se

▼M8

slučaju mogu primjenjivati različiti kriteriji prihvatljivosti od kriterija navedenih u tablici 2. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (u uvjetima ispitne metode za kontrolu kvalitete) treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili dobavljač tog modela.

Tablica 2.

Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (za korisnike testa)

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (za protokole za tekućine i krute tvari)	> 0,8 ([1])	< 2,5
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (za protokole za tekućine i krute tvari)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) U ovom ograničenju prihvatljivosti uzima se u obzir mogućnost produljenog vremena otpreme/skladištenja (npr. > 4 dana), za što se pokazalo da ne utječe na uspješnost ispitne metode (37.).

Funkcija barijere

27. Model tkiva RhCE treba biti dovoljno debeo i čvrst kako bi onemogućio brzu penetraciju citotoksičnih referentnih tvari, kako je procijenjeno npr. vrijednošću ET_{50} (Triton X-100) ili IC_{50} (SDS) (tablica 3.). Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela tkiva RhCE koji se upotrebljava (vidjeti stavak 30.).

Morfologija

28. Histološko ispitivanje modela tkiva RhCE trebalo bi pokazivati strukturu epitela koja nalikuje ljudskoj rožnici (uključujući barem tri sloja vijabilnih stanica epitela i nekeratiniziranu površinu). Subjekt koji je razvio model ili dobavljač utvrdio je odgovarajuću morfologiju za validirane referentne metode te je stoga korisnik ispitne metode ne mora ponovno dokazivati za svaku šaržu tkiva.

Obnovljivost

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

Kontrola kvalitete (KK)

30. Model tkiva RhCE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela tkiva RhCE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost (stavak 26.) i funkcija barijere (vidjeti stavak 27.). Raspon prihvatljivosti (gornje i donje granice) za funkcije barijere, kako se mjeri vrijednošću ET_{50} ili IC_{50} (vidjeti stavke 25. i 26.), treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač. Raspon prihvatljivosti vrijednosti ET_{50} i IC_{50} koji subjekt koji je razvio modele tkiva RhCE (koji se upotrebljavaju u validiranim referentnim metodama) ili njihov dobavljač upotrebljava kao kriterij za kontrolu kvalitete šarže naveden je u tablici 3. Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač treba korisnicima ispitne metode dostaviti podatke kojima se dokazuje usklađenost sa svim kriterijima za odobrenje proizvoda kako bi korisnici mogli uključiti te informacije u izvješće o ispitivanju. Samo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju sve te kriterije za odobrenje proizvoda mogu se prihvatiti za pouzdano predviđanje kemikalija koje ne treba razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om.

▼M8

Tablica 3.

Kriterij za kontrolu kvalitete šarže

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

31. Za svaku ispitivanu kemikaliju i svaku kontrolnu tvar trebalo bi upotrijebiti najmanje dva ponovljena uzorka tkiva u svakom ciklusu. Upotrebljavaju se dva različita protokola za tretiranje, jedan za tekuće ispitivane kemikalije i jedan za kemikalije u krutom stanju (34. i 35.). Kod obje metode i oba protokola površinu modela tkiva treba navlažiti Dulbeccovom fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom bez kalcija i magnezija (DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}) prije primjene ispitivanih kemikalija kako bi se oponašali vlažni uvjeti ljudskog oka. Tretiranje tkiva započinje izlaganjem ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima. Kod oba protokola za tretiranje u obje validirane ispitne metode treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije ili kontrolne tvari kako bi se ravnomjerno prekrila površina epitela tako da se izbjegne beskonačna doza (vidjeti stavke 32. i 33.) (Dodatak 2.).

32. Ispitivane kemikalije koje se mogu pipetirati pri temperaturi od 37 °C ili nižoj (prema potrebi upotrebom pipete koja radi na načelu pozitivnog istisnog volumena) tretiraju se kao tekućine u validiranim referentnim metodama, a u suprotnom bi se trebale tretirati kao kemikalije u krutom stanju (vidjeti stavak 33.). U validiranim referentnim metodama tekuće ispitivane kemikalije ravnomjerno se nanose na površinu tkiva (tj. primjenjuje se najmanje 60 µl/cm^2) (vidjeti Dodatak 2., 33. i 34.). Kapilarnost (učinak površinske napetosti) do koje može doći zbog malih volumena koji se primjenjuju na umetak (na površinu tkiva) treba izbjegavati u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zajamčilo točno doziranje tkiva. Tkiva tretirana tekućim ispitivanim kemikalijama inkubiraju se 30 minuta u standardnim uvjetima kulture (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %). Na kraju razdoblja izlaganja tekuću ispitivanu kemikaliju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca^{2+}/Mg^{2+} na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi nakon izlaganja (kako bi se uklonila ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi. Samo u slučaju metode VRM1 prije provedbe MTT testa primjenjuje se inkubacija nakon izlaganja u svježem mediju u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).

33. Ispitivane kemikalije koje se ne mogu pipetirati pri temperaturama do 37 °C u validiranim referentnim metodama tretiraju se kao krute tvari. Količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje treba biti dovoljna kako bi se prekrila cijela površina tkiva, tj. treba primijeniti najmanje 60 mg/cm^2 (Dodatak 2.). Kad god je to moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Tkiva tretirana ispitivanim kemikalijama u krutom stanju inkubiraju se u unaprijed utvrđenom razdoblju (ovisno o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi) u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju u krutom stanju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca^{2+}/Mg^{2+} na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja, a prije provedbe MTT testa, nakon izlaganja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi (kako bi se uklonila

▼M8

ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju, koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi, te inkubacija u svježem mediju nakon izlaganja u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).

34. U svaki ciklus treba uključiti istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (utvrđena negativnom kontrolom) i osjetljivost (utvrđena pozitivnom kontrolom) tkiva u okviru raspona prihvatljivosti koji su utvrđeni na temelju prijašnjih podataka. Istodobna negativna kontrola pruža i osnovicu (100-postotna vijabilnost) za izračun postotka relativne vijabilnosti tkiva tretiranih ispitivanom kemikalijom (%vijabilnost$_{test}$). Kao tvar za pozitivnu kontrolu za upotrebu s validiranim referentnim metodama preporučuje se čisti metil-acetat (CAS br. 79-20-9, komercijalno dostupan kod npr. društva Sigma-Aldrich, Cat# 45997; tekućina). Kao tvari za negativnu kontrolu za upotrebu s metodama VRM1 i VRM2 preporučuju se ultračisti H_2O i DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Te su se kontrolne tvari upotrebljavale u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda i za njih postoji najviše prijašnjih podataka. Upotrebu primjerenih alternativnih tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu treba znanstveno i primjereno obrazložiti. Negativne i pozitivne kontrole treba ispitati primjenom istih protokola kao što su oni koji su upotrijebljeni za ispitivane kemikalije uključene u ciklus (tj. za tekućine i/ili kemikalije u krutom stanju). Nakon te primjene slijedi tretiranje izlaganjem, ispiranje, uranjanje nakon izlaganja i inkubacija nakon izlaganja, ako je primjenjivo, kako je opisano za kontrole koje se provode istodobno s tekućim ispitivanim kemikalijama (vidjeti stavak 32.) ili za kontrole koje se provode istodobno s ispitivanim kemikalijama u krutom stanju (vidjeti stavak 33.), prije provedbe MTT testa (vidjeti stavak 35. i literaturu pod 34. i 35.). Jedan skup negativnih i pozitivnih kontrola dovoljan je za sve ispitivane kemikalije u istom agregatnom stanju (tekućine ili kemikalije u krutom stanju) uključene u isti ciklus.

Mjerenja vijabilnosti tkiva

35. MTT test standardizirana je kvantitativna metoda (16.) koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti tkiva u okviru ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. MTT test provodi se neposredno nakon razdoblja inkubacije nakon izlaganja. Kod validiranih referentnih metoda uzorak modela tkiva RhCE stavlja se u 0,3 ml otopine MTT-a koncentracije 1 mg/ml na 180 ± 15 min u standardnim uvjetima kulture. Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana. Nataloženi proizvod plavog MTT formazana zatim se ekstrahira iz tkiva upotrebom primjerenog volumena izopropanola (ili sličnog otapala) (34. i 35.). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim kemikalijama treba ekstrahirati i iz gornjeg i donjeg dijela tkiva, dok tkiva koja se ispituju kemikalijama u krutom stanju i obojenim tekućinama treba ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva (kako bi se smanjila potencijalna kontaminacija ekstrakcijske otopine izopropanola ispitivanom kemikalijom koja je možda ostala u tkivu). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim kemikalijama koje nije jednostavno isprati isto se mogu ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva. Tvari za negativnu i pozitivnu kontrolu koje se ispituju istodobno treba tretirati slično kao i ispitivane kemikalije. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati mjerenjem standardne apsorbancije (OD) na 570 nm upotrebom pojasa propuštanja do najviše ±30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 42. i literaturu pod 11. i 36.).

▼**M8**

36. Optička svojstva ispitivanih kemikalija ili njihovo kemijsko djelovanje na MTT može utjecati na mjerenje MTT formazana, što dovodi do pogrešne procjene vijabilnosti tkiva. Ispitivane kemikalije mogu utjecati na mjerenje MTT formazana izravnom redukcijom MTT-a u plavi MTT formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka obrade, u istom rasponu optičke gustoće kao i MTT formazan (tj. približno 570 nm). Prije ispitivanja treba provesti prethodne provjere kako bi se omogućilo utvrđivanje potencijalnih tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalija koje interferiraju s bojom te se trebaju upotrijebiti dodatne kontrole za otkrivanje i ispravljanje moguće interferencije tih ispitivanih kemikalija (vidjeti stavke od 37. do 41.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s modela tkiva RhCE ili prodre u epitel koji nalikuje rožnici te je stoga prisutna u modelima tkiva RhCE pri provođenju MTT testa. Za ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja), koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana zbog prejake interferencije, tj. jake apsorbancije na 570 ± 30 nm, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 41. i 42.) (11. i 36.). Podroban opis načina na koji se otkrivaju i ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije s bojilima dostupan je u standardnim operativnim postupcima za validirane referentne metode (34. i 35.). Ilustrativni dijagrami toka koji daju smjernice o tome kako utvrditi kemikalije koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalije koje interferiraju s bojom te kako postupati s njima u okviru VRM1 i VRM2 navedeni su u dodacima III. i IV.

37. Kako bi se utvrdila potencijalna interferencija ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, ispitivana kemikalija dodaje se vodi i/ili izopropanolu te se inkubira na odgovarajuće vrijeme na sobnoj temperaturi (vidjeti Dodatak 2. te literaturu pod 34. i 35.). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira dovoljno svjetlosti u rasponu od 570 ± 20 nm za VRM1 (vidjeti Dodatak 3.) ili ako se miješanjem ispitivane kemikalije s vodom za VRM2 dobije obojena otopina (vidjeti Dodatak 4.), pretpostavlja se da ispitivana kemikalija utječe na mjerenje standardne apsorbancije (OD) MTT formazana i treba provesti daljnje kontrole bojila ili treba upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije, u kojem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 41. i 42., dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaku interferirajuću ispitivanu kemikaliju treba primijeniti na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a, kako bi se provela kontrola nespecifične boje u živim tkivima (NSC_{living}) (34. i 35.). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno uz ispitivanje obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a ($\%Vijabilnost_{test}$), umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, koji se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja ($\%NSC_{living}$), tj. prava vijabilnost tkiva = $[\%Vijabilnost_{test}] - [\%NSC_{living}]$.

38. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Primjerena količina ispitivane kemikalije dodaje se otopini MTT-a i smjesa se inkubira približno tri sata u standardnim uvjetima kulture (vidjeti dodatke

▼**M8**

III. i IV.) (34. i 35.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju (ili suspenziju za netopljive ispitivane kemikalije) postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih modela tkiva RhCE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju i zadržavaju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao i vijabilna tkiva. Mrtva tkiva za metodu VRM1 pripremaju se izlaganjem niskoj temperaturi („usmrćivanje zamrzavanjem"). Mrtva tkiva za metodu VRM2 pripremaju se produljenom inkubacijom (npr. najmanje 24 ± 1 h) u vodi, nakon čega slijedi skladištenje na niskoj temperaturi („usmrćivanje vodom"). Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se provela kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) (34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima tvari koja reducira MTT (%Vijabilnost$_{test}$), umanjen za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobiven s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja (%NSMTT), tj. prava vijabilnost tkiva = [%Vijabilnost$_{test}$] – [%NSMTT].

39. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da interferiraju s bojom (vidjeti stavak 37.) i izravno reduciraju MTT (vidjeti stavak 38.) bit će potreban i treći skup kontrola pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) osim kontrola NSMTT i NSC$_{living}$ opisanih u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Zbog toga je automatski obvezna upotreba kontrola NSMTT, zajedno s kontrolama NSC$_{living}$. I živa i mrtva tkiva mogu apsorbirati i zadržati ispitivane kemikalije za koje se provode i kontrola NSMTT i kontrola NSC$_{living}$. Stoga se u tom slučaju kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u mrtvim tkivima. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC$_{living}$ već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u živim tkivima. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC$_{killed}$) (vidjeti dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC$_{killed}$ po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji (%Vijabilnost$_{test}$), umanjeno za %NSMTT i %NSC$_{living}$ te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja (%NSC$_{killed}$), tj. prava vijabilnost tkiva = [%Vijabilnost$_{test}$] – [%NSMTT] – [%NSC$_{living}$] + [%NSC$_{killed}$].

▼M8

40. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i interferencije s nespecifičnim bojama mogu povećati optičku gustoću (kod mjerenja standardne apsorbancije) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra i da nespecifična redukcija MTT-a može povećati i površinu pika MTT formazana (kod mjerenja HPLC/UPLC spektrofotometrijom) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga važno je da svaki laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe utvrdi raspon linearnosti optičke gustoće/površine pika svojeg spektrofotometra, npr. s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7), komercijalno dostupnim kod npr. društva Sigma-Aldrich (Cat# M2003).

41. Mjerenje standardne apsorbancije spektrofotometrom primjereno je za procjenu kemikalija koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je uočena interferencija kod mjerenja MTT formazana prevelika (tj. vrijednosti optičke gustoće ekstrakata tkiva dobivenih s ispitivanom kemikalijom bez ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar su linearnog raspona spektrofotometra). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili 50 % (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju) negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to utvrđena granična vrijednost koja se u validiranim referentnim metodama upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 44.). Međutim, standardna apsorbancija ne može se mjeriti kada je interferencija s mjerenjem MTT formazana prejaka (tj. kada dovodi do neispravljenih vrijednosti optičke gustoće ispitivanih ekstrakata tkiva izvan linearnog raspona spektrofotometra). Obojene ispitivane kemikalije ili ispitivane kemikalije koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom koje prejako interferiraju s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana mogu se procijeniti primjenom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti dodatke III. i IV.). Razlog je tome što sustav HPLC/UPLC omogućuje izdvajanje MTT formazana iz kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak treba upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT (nakon postupka opisanog u stavku 38.). Kontrole NSMTT treba upotrijebiti i s ispitivanim kemikalijama koje imaju boju (intrinzičnu ili koja se javlja u vodi) koja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao: $\%Vijabilnost_{test}$ umanjeno za %NSMTT, kako je opisano u posljednjoj rečenici stavka 38. Naposljetku, treba napomenuti da se ispitnim metodama RhCE ne mogu procijeniti kemikalije koje izravno reduciraju MTT ili kemikalije koje izravno reduciraju MTT koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koje su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako se očekuje da će se one javljati samo u iznimno rijetkim slučajevima.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (11. i 36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije nije izvedivo da svaki korisnik

▼M8

uspostavi identične uvjete sustava. Stoga bi kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 38.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 5. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 5., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

43. Za svaki ciklus u kojem se upotrebljavaju šarže tkiva RhCE koje ispunjavaju kontrolu kvalitete (vidjeti stavak 30.), tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu trebala bi imati optičku gustoću koja odražava kvalitetu tkiva za koja su poštovani koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola i koja ne bi smjela biti izvan prethodno utvrđenih granica opisanih u tablici 2. (vidjeti stavak 26.). Slično tome, tkiva tretirana s tvari za pozitivnu kontrolu, tj. metilacetatom, trebaju pokazivati srednju vijabilnost tkiva < 50 % u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM1 s protokolom za tekućine ili kemikalije u krutom stanju i ≤ 30 % (protokol za tekućine) ili ≤ 20 % (protokol za kemikalije u krutom stanju) u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM2, što odražava sposobnost tkiva da odgovore na nadražujuću ispitivanu kemikaliju u uvjetima ispitivane metode (34. i 35.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima trebala bi biti unutar prihvaćenih granica (tj. razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 % odnosno standardna devijacija u tri ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 18 %). Ako je negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost između ponovljenih uzorka tkiva s ispitivanom kemikalijom izvan prihvaćenog raspona, mora se smatrati da test ne ispunjava zahtjeve i ispitivanu kemikaliju treba ponovno ispitati.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

44. Vrijednosti optičke gustoće/površine pika dobivene s ponovljenim ekstraktima tkiva za svaku ispitivanu kemikaliju treba upotrebljavati za izračun srednjeg postotka vijabilnosti tkiva (srednja vrijednost među ponovljenim uzorcima tkiva) normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. Granična vrijednost postotka vijabilnosti tkiva za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje ne treba razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) navedena je u tablici 4. Rezultate stoga treba tumačiti na sljedeći način:

— utvrđuje se da ispitivanu kemikaliju ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om (bez kategorije) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja veći od (>) utvrđene granične vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, kako je prikazano u tablici 4. U tom slučaju nije potrebno daljnje ispitivanje drugim ispitnim metodama,

▼M8

— ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja te inkubacije nakon izlaganja manji od ili jednak (≤) utvrđenoj graničnoj vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, predviđanje nije moguće, kako je prikazano u tablici 4. U tom će slučaju biti potrebno daljnje ispitivanje s drugim ispitnim metodama jer ispitne metode RhCE pokazuju određeni broj lažno pozitivnih rezultata (vidjeti stavke 14. i 15.) i ne razlikuju kategorije 1. i 2. prema sustavu UN GHS i CLP-u (vidjeti stavak 17.).

Tablica 4.

Modeli predviđanja u skladu s razvrstavanjem prema sustavu UN GHS i CLP-u

VRM	Bez kategorije	Predviđanje nije moguće
VRM 1 – EIT EpiOcular™ (za oba protokola)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM 2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za tekućine)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za kemikalije u krutom stanju)	Srednja vijabilnost tkiva > 50 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 50 %

45. Jedan test koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je rezultat nedvosmislen. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti tkiva od 60 ± 5 % (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili 50 ± 5 % (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju), trebalo bi razmotriti drugi test, a i treći test u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva testa.

46. Za specifične vrste smjesa mogu se razmotriti različite granične vrijednosti postotaka vijabilnosti tkiva prema kojima se razvrstane ispitivane kemikalije razlikuju od nerazvrstanih, ako je primjereno i obrazloženo, kako bi se povećala ukupna uspješnost ispitne metode za te vrste smjesa (vidjeti stavak 14.). Referentne kemikalije mogu biti korisne za procjenu potencijala nepoznate ispitivane kemikalije ili razreda proizvoda da uzrokuju tešku ozljedu oka/nadraživanje oka ili za procjenu relativne potencijalne okularne toksičnosti razvrstane kemikalije unutar specifičnog raspona pozitivnih odgovora.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

47. Podatke iz pojedinačnih ponovljenih tkiva u ciklusu (npr. podaci o vrijednosti optičke gustoće/površini pika MTT formazana i izračunanom postotku vijabilnosti tkiva za ispitivanu kemikaliju i kontrole te konačno predviđanje na temelju ispitne metode RhCE) treba navesti u obliku tablice za svaku ispitivanu kemikaliju, prema potrebi uključujući i podatke iz ponovljenih testova. Osim toga, treba navesti i srednji postotak vijabilnosti tkiva i razliku vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva (ako je n = 2 ponovljena uzorka tkiva) ili standardnu devijaciju (ako je n ≥ 3 ponovljena uzorka tkiva) za svaku pojedinačnu ispitivanu kemikaliju i kontrolu. Za svaku ispitanu kemikaliju treba navesti svaku uočenu interferenciju s mjerenjem MTT formazana koje ispitivana kemikalija uzrokuje izravnom redukcijom MTT-a i/ili interferencijom s bojom.

Izvješće o ispitivanju

48. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

▼**M8**

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

— opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— agregatno stanje i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— agregatno stanje, hlapljivost, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe negativne kontrole koja nije ultračisti H_2O ili DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+},

— ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe pozitivne kontrole koja nije čisti metil-acetat,

— upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne i negativne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa.

Informacije o naručitelju i ustanovi koja provodi ispitivanje:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja.

— *Upotrijebljeni model tkiva RhCE i protokol (uz obrazloženje odabira ako je primjenjivo)*

▼**M8**

Uvjeti primjene ispitne metode:

— upotrijebljeni model tkiva RhCE, uključujući broj šarže,

— valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja (npr. spektrofotometra),

— opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,

— opis upotrijebljenog sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,

— potpune popratne informacije o konkretnom modelu tkiva RhCE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

  i. kontrolu kvalitete vijabilnosti (dobavljač);

  ii. vijabilnost u uvjetima primjene ispitne metode (korisnik);

  iii. kontrolu kvalitete funkcije barijere;

  iv. morfologiju ako je dostupna;

  v. obnovljivost i prediktivnu sposobnost;

  vi. druge kontrole kvalitete (KK) modela tkiva RhCE ako su dostupne,

— upućivanje na prijašnje podatke za model tkiva RhCE. To bi, među ostalim, trebalo uključivati: prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,

— izjava o tome da je ustanova koja provodi ispitivanje dokazala osposobljenost za upotrebu ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

— srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Ispitni postupak:

— pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku,

— doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari,

— trajanja i temperature izlaganja, uranjanja nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja (ako je primjenjivo),

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

▼M8

— oznake kontrola koje se koriste za tvari koje neposredno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

— broj ponovljenih uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, ako je primjenjivo).

Rezultati

— tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrolne tvari za svaki ciklus (uključujući ponovljene pokuse ako je primjenjivo) i svako ponovljeno mjerenje, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardne devijacije te konačno predviđanje,

— ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za kemikalije koje neposredno reduciraju MTT i/ili obojenih ispitivanih kemikalija, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, razliku između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardnu devijaciju, konačni točni postotak vijabilnosti tkiva i konačno predviđanje,

— rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,

— opis drugih uočenih učinaka, npr. ako obojena ispitivana kemikalija oboji tkiva.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York i Ženeva. United Nations. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

2. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje oka.

3. Poglavlje B.47. ovog Priloga, Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

4. Poglavlje B.48. ovog Priloga, Metoda ispitivanja na izoliranom pilećem oku za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

5. Poglavlje B.61. ovog Priloga, Metoda ispitivanja propuštanja fluoresceina za identifikaciju tvari nagrizajućih i jako nadražujućih za oči.

▼**M8**

6. Poglavlje B.68. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja za utvrđivanje: i. kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.

7. Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261.–266.

8. EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Dostupno na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

9. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 od 17. studenoga 2014.; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Dostupno na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

10. Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43.–53.

11. Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55.–70.

12. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 od 24. lipnja 2016.; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Dostupno na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

13. EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Rukopis u pripremi).

14. Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377.–390.

15. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.

▼**M8**

16. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.

17. OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

18. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

19. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339.–364.

20. Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. U: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, str. 147.–159.

21. Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619.–626.

22. Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476.–1488.

23. Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1.–18.

24. Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701.–723.

25. Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521.–547.

26. Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113.–126.

▼**M8**

27. Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. U: *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, str. 749.–815. Washington, DC, SAD: Hemisphere Publishing Corporation.

28. Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, str. 665.–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

29. Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922.–936.

30. Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106.–117.

31. Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115.–130.

32. Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610.–2625.

33. Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41.–54.

34. EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

35. SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741.–761.

37. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101.–127.

38. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

39. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti”. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (18.).

Referentna kemikalija: kemikalija koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna kemikalija trebala bi imati sljedeća svojstva: i. dosljedne i pouzdane izvore za njezinu identifikaciju i karakterizaciju; ii. strukturnu, funkcionalnu i/ili kemijsku sličnost ili razred proizvoda sličan kemikalijama koje se ispituju; iii. poznata fizikalno-kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci; i v. poznatu jakost u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje i označivanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje i označivanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: vidjeti „Točnost”.

Rožnica: transparentni dio prednje strane očne jabučice kojim su prekrivene šarenica i zjenica i koji propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

CV: koeficijent varijacije.

Dev.: odstupanje.

EIT: test nadraživanja oka.

EURL ECVAM: referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama.

Nadraživanje oka: promjene na oku nastale kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

ET_{50}: vrijeme izlaganja potrebno za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

HCE: epitel ljudske rožnice SkinEthic™.

▼M8

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IC_{50}: koncentracija pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja SDS-om).

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na model tkiva RhCE koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epitela.

Ireverzibilni učinci na oko: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

LLOQ: donja granica kvantifikacije.

LogP: logaritam podjelnog koeficijenta oktanol-voda.

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

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

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

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

Negativna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da ne inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima te se upotrebljava kako bi se utvrdila 100-postotna vijabilnost tkiva.

Nerazvrstano: kemikalije koje nisu razvrstane s obzirom na nadraživanje oka (kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a, kategorija 2.A ili 2.B sustava UN GHS) ili tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u”.

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC_{living}: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi koja se smatrala znanstveno valjanom i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; i iii. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (18.).

▼M8

Pozitivna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (18.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (18.).

Zamjensko ispitivanje: ispitivanje koje zamjenjuje rutinsko i prihvaćeno ispitivanje za određivanje opasnosti i/ili procjenu rizika, za koje je utvrđeno da osigurava istovjetnu ili bolju zaštitu zdravlja ljudi, zdravlja životinja ili okoliša u odnosu na prihvaćeno ispitivanje u svim mogućim okolnostima ispitivanja i za sve kemikalije (18.).

Obnovljivost: podudarnost rezultata dobivenih ponovljenim ispitivanjem iste ispitivane kemikalije uz primjenu istog ispitnog protokola (vidjeti „pouzdanost”) (18.).

Reverzibilni učinci na oko: vidjeti „nadraživanje oka”.

RhCE: rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici.

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

SD: standardna devijacija.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

▼M8

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane tvari na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Standardni operativni postupci (SOP): formalni, pisani postupci kojima se podrobno opisuje kako treba provoditi specifične rutinske laboratorijske operacije i operacije specifične za test. Obvezni su na temelju dobre laboratorijske prakse.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

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

Test: jedna ispitivana kemikalija koja se istodobno ispituje na najmanje dva ponovljena uzorka tkiva kako je utvrđeno u odgovarajućem SOP-u.

Vijabilnost tkiva: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica u rekonstruiranom tkivu u obliku njihove sposobnosti da reduciraju vitalnu boju MTT, što ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da inducira tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

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

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevitog ispitivanja u kojoj se ispitne metode upotrebljavaju sekvencijski. Sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju se na svakoj razini, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu strategije primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal/jakost opasnog djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno (18.).

ULOQ: gornja granica kvantifikacije.

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

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u: kemikalije koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. sustava UN GHS/CLP-a (ili kategoriju 2.A ili 2.B sustava UN GHS). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „nerazvrstano”.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

▼**M8**

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

Valjana ispitna metoda: ispitna metoda za koju se smatra da je dovoljno relevantna i pouzdana za određenu svrhu te koja se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitna metoda nije nikada valjana u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (18.).

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (18.).

VRM: validirana referentna metoda.

VRM1: test nadraživanja oka EpiOcular™ naziva se validiranom referentnom metodom 1.

VRM2: test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ naziva se validiranom referentnom metodom 2.

Analiza snage dokaza: proces razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti ispitivane tvari.

▼M8

Dodatak 2.

GLAVNI ELEMENTI TESTOVA RHCE VALIDIRANIH ZA UTVRĐIVANJE KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Protokoli	Tekućine (koje se mogu pipetirati na temperaturi od 37 ± 1 °C ili nižoj 15 min)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)	Tekućine i viskozne kemikalije (mogu se pipetirati)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)
Površina modela	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Broj ponovljenih uzoraka tkiva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	50 µl + 1 ml H_2O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) ili 50 µl + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 mg + 1 ml H_2O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) i/ili 50 mg + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene i bezbojne ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 µl + 90 µl H_2O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi (18–28 °C) → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 mg + 90 µl H_2O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu

▼M8

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	otopina 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem (kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	otopina 50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem (kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	otopina 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	30 mg + 300 µl MTT otopina 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)
Prethodna obrada	20 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} tijekom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	20 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} tijekom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	–	–
Doze za tretiranje i primjena	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) upotrebom kalibriranog alata (npr. žlica kalibrirana tako da sadržava 50 mg natrijeva klorida kada je vrhom puna)	10 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Za viskozne kemikalije upotrijebiti najlonsku mrežu	30 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 mg (60 mg/cm_2)
Vrijeme i temperatura izloženosti	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	6 sati (± 0,25 sati) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	4 sata (± 0,1 sat) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Ispiranje na sobnoj temperaturi	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca_{2+}/Mg^{2+}	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Uranjanje nakon izlaganja	12 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	25 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture

▼M8

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Inkubacija nakon izlaganja	120 min (± 15 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	18 h (± 0,25 h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	nema	18 h (± 0,5 h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Negativna kontrola	50 µl H_2O Ispitano istodobno	50 µl H_2O Ispitano istodobno	30 ± 2 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Ispitano istodobno	30 ± 2 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Ispitano istodobno
Pozitivna kontrola	50 µl metilacetata Ispitano istodobno	50 µl metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 µl metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 µl metilacetata Ispitano istodobno
Otopina MTT-a	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Ekstrakcijsko otapalo	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka bušenjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka bušenjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na 4–10 °C	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na 4–10 °C	4 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili barem preko noći bez protresanja na 4–10 °C	Najmanje 2 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp.
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

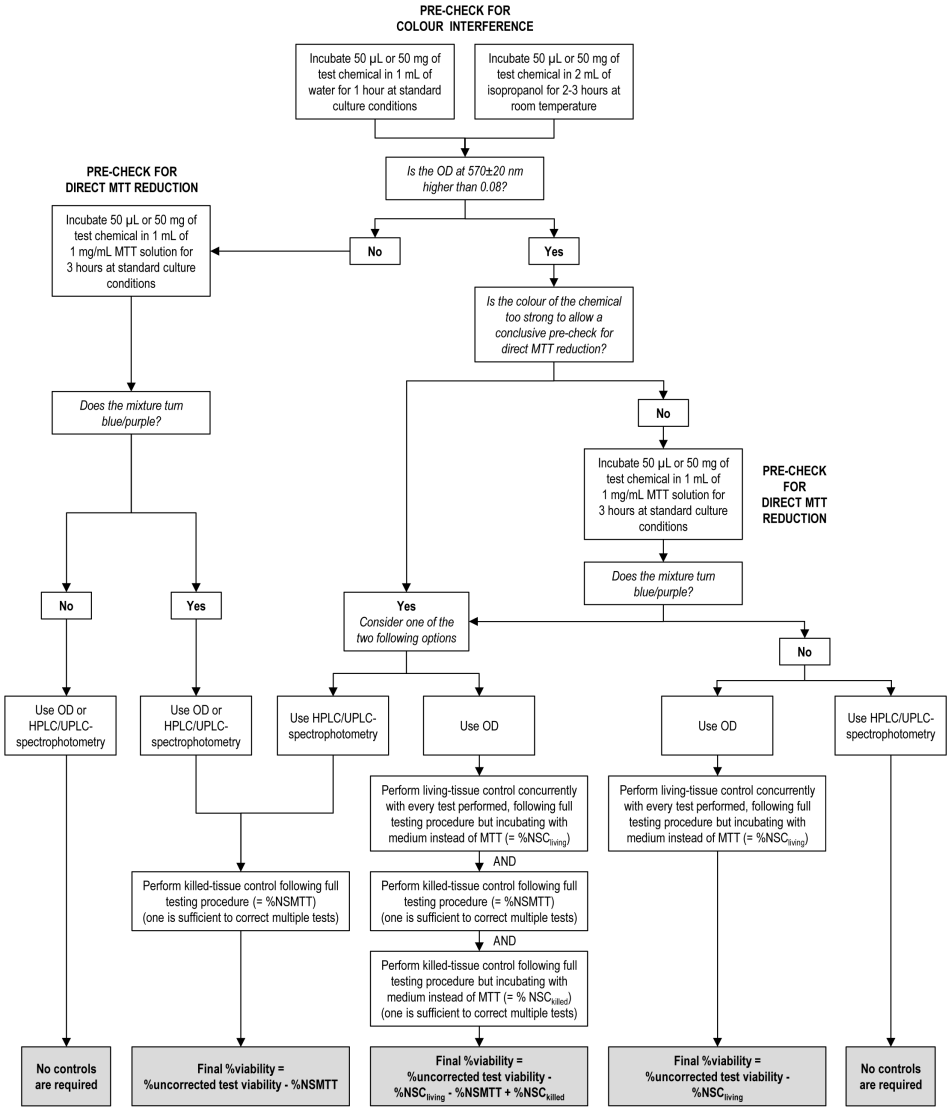
▼M8

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 0,8 i < 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 0,8 i < 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na šest sati, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 1,0 i ≤ 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 30 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 1,0 i ≤ 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.

▼**M8**

Dodatak 3.

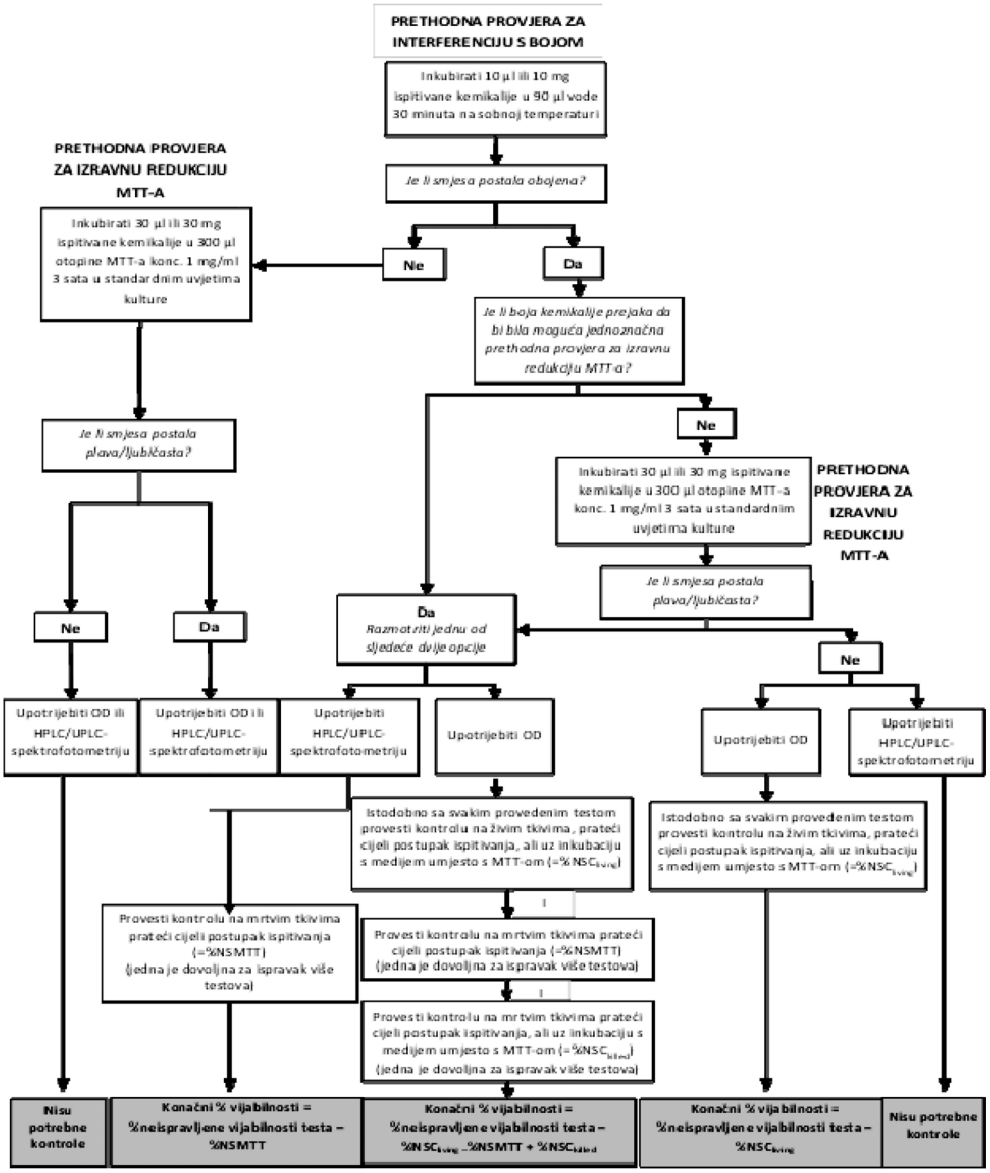
ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI KEMIKALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/ILI KEMIKALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM1



▼**M8**

Dodatak 4.

ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI KEMIKALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/ILI KEMIKALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM2



▼**M8**

Dodatak 5.

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

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 38.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela živih tkiva RhCE bez ikakve obrade), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela mrtvih tkiva RhCE bez ikakve obrade) i boje (npr. metilensko plavilo)	$Površina_{interference} \leq 20\ \%\ površine_{LLOQ}$ ([1])
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	85 % ≤ % učinka matrice ≤ 115 %
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ([2])	$Površina_{interference} \leq 20\ \%\ površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: %Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ Kontrole kvalitete: %Dev ≤ 15 % i CV ≤ 15 %
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	%Dev ≤ 15 %
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na –20 °C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola (~ 70 µg/ml u validiranoj referentnoj metodi), tj. 200 µg/ml.

▼M8

B.70. *IN VITRO* TESTOVI LJUDSKOG REKOMBINANTNOG ESTROGENSKOG RECEPTORA (hrER) ZA OTKRIVANJE KEMIKALIJA S AFINITETOM VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR

OPĆI UVOD

OECD-ova smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 493 (TG) (2015.). Smjernica za ispitivanje 493 jest smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti (PBTG), u kojoj se opisuje metodologija za *in vitro* testove ljudske rekombinante za otkrivanje tvari s afinitetom vezivanja na estrogenske receptore (testovi vezivanja na hrER). Sastoji se od dva mehanicistički i funkcionalno slična testa za identifikaciju kemikalija koje se vežu na estrogenske receptore (tj. ERα) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih testova u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvaćanju novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti uključuju:

— Freyberger-Wilsonov (FW) *in vitro* test vezivanja na estrogenske receptore (ER) upotrebom cijelog ljudskog rekombinantnog receptora ERα (2.), i

— *in vitro* test vezivanja na estrogenski receptor upotrebom ljudskog rekombinantnog proteina domene vezivanja liganda koji je razvio CERI (Institut za procjenu i istraživanje kemikalija) (2.).

Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) (3.) za lakši razvoj i validaciju sličnih ispitnih metoda za istu krajnju točku opasnosti te omogućivanje pravovremene izmjene PBTG-a 493 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG. Međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvedbe. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 493 mogu se upotrebljavati neselektivno za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja vezivanja na estrogenske receptore, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta u cilju revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okvir uključeni su kao prilozi Vodiču o standardiziranim smjernicama za ispitivanje za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (4.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi vezivanja na estrogenske receptore opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena za *in vitro* testove vezivanja na receptor osmišljene za identifikaciju liganda na ljudski estrogenski receptor alfa (ERα).

▼**M8**

3. Relevantnost *in vitro* testa vezivanja na estrogenske receptore za biološke funkcije jasno je dokazana. Testovi vezivanja na estrogenski receptor osmišljeni su za utvrđivanje kemikalija koje potencijalno mogu ometati hormonski put estrogena te su se u posljednja dva desetljeća često upotrebljavali za opisivanje distribucije estrogenskog receptora u tkivu i za utvrđivanje agonista/antagonista estrogenskog receptora. Tim se testovima oponaša interakcija liganda i receptora koja čini početni korak estrogenskog signalnog puta i ključna je za reproduktivnu funkciju svih kralježnjaka.

4. Interakcija estrogena i estrogenskog receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen i inducirati negenomske učinke, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, uobičajeni fetalni razvoj i reproduktivnu funkciju (5., 6. i 7.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sustava potencijalno može uzrokovati štetne učinke na uobičajeni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava. Neispravno signaliziranje estrogenskog receptora može dovesti do učinaka kao što su povećani rizik od karcinoma koji ovise o hormonima, smanjenje plodnosti te promjene fetalnog rasta i razvoja (8.).

5. *In vitro* testovi vezivanja temelje se na izravnoj interakciji tvari sa specifičnim mjestom vezivanja liganda na receptor koje regulira transkripciju gena. Ključni element testa vezivanja na ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (hrERα) mjeri sposobnost radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) da se veže na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenata). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda i evidentirala specifičnost estrogenskog receptora, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.

6. Validacijske studije CERI-jevog i FW testa vezivanja pokazale su njihovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu (2.).

7. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene testova vezivanja na receptore i ograničenja povezana s njima

8. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i informacije za početni molekularni događaj (MIE) koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Testovima se ispituje kemijsko vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.

▼**M8**

9. Vezivanje prirodnog liganda, 17β-estradiola, početni je korak u nizu molekularnih događaja koji aktivira transkripciju ciljnih gena i naposljetku kulminira fiziološkom promjenom (9.). Stoga se vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα smatra jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije posredovane estrogenskim receptorom, iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s mjestima na receptoru ERα koja nisu džep za vezivanje liganda; ii. interakcije s ostalim receptorima relevantnima za signaliziranje estrogena, receptorom ERβ i estrogenskim receptorom spregnutim s G-proteinima, ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; iii. sintezu hormona; iv. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; v. distribuciju hormona u ciljna tkiva i vi. uklanjanje hormona iz tijela. Nijedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.

10. Ovom ispitnom metodom ispituje se sposobnost tvari da se vežu na ljudski receptor ERα i njome se ne razlikuju agonisti i antagonisti receptora ERα. Test se ne bavi daljnjim događajima kao što su transkripcija gena ili fiziološke promjene. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari s jednim sastojkom, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Unatoč tomu, testovi su u teoriji primjenjivi i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

11. Sustavi receptora koji ne sadržavaju stanice nemaju intrinzičnu metaboličku sposobnost i nisu validirani u kombinaciji s metaboličkim enzimskim sustavima. Međutim, metabolička aktivnost možda se može uključiti u plan istraživanja, ali za to bi bila potrebna dodatna validacija.

12. Kemikalije koje mogu denaturirati protein (tj. protein receptora), kao što su površinski aktivne tvari ili kemikalije koje mogu promijeniti pH-vrijednost testnog pufera, ne mogu se ispitati ili se mogu ispitati samo pri koncentracijama kod kojih nema tih interakcija. Osim toga, raspon koncentracija koji se može ispitati u testovima za ispitivanu kemikaliju ograničen je njezinom topljivošću u testnom puferu.

13. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja za 24 tvari koje su ispitane u oba potpuno validirana testa opisana u ovoj ispitnoj metodi. Na temelju objavljenih izvješća, od tih tvari 17 ih je razvrstano kao kemikalije koje se vežu na estrogenski receptor, a šest kao kemikalije koje se ne vežu, uključujući *in vitro* testove za transkripcijsku aktivaciju estrogenskog receptora i/ili uterotrofni test (9., 10., 11., 12., 13., 14. i 15.). S obzirom na podatke sažete u tablici 1., postojala je gotovo 100-postotna podudarnost između dva testa u vezi s razvrstavanjem svih tvari do 10^{-4} M i svaka je tvar točno razvrstana kao kemikalija koja se veže ili ne veže na estrogenske receptore. Dodatne informacije o ovoj skupini tvari i o dodatnim tvarima koje su ispitane u testovima vezivanja na estrogenske receptore tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za test vezivanja na hrER (3.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

▼M8

Tablica 1.

Razvrstavanje tvari kao kemikalija koje se vežu ili ne vežu na estrogenske receptore kada se ispituju u FW i CERI-jevom testu vezivanja na hrER

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERI-jev test		Kemijski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
1	17β-estradiol	50-28-2	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel	68-23-5	*Kemikalija koja se veže*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Noretindron	68-22-4	*Kemikalija koja se veže*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
4	Di-n-butil-ftalat	84-74-2	*Kemikalija koja se ne veže (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže (**) (+)	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijski međuproizvod
5	DES	56-53-1	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (hetero-cikl.), flavonoid	Prirodni proizvod

▼M8

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERI-jev test		Kemijski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
9	Ekvuol	531-95-3	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Metabolit fitoestrogena	Prirodni proizvod
10	Butil paraben (*n* butil-4-hidroksiben-zoat)	94-26-8	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Paraben	Konzervans
11	Nonilfenol (smjesa)	84852-15-3	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuspoj
12	o,p'-DDT	789-02-6	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Organoklor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	*Kemikalija koja se ne veže (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
14	Zearalenon	17924-92-4	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (hetero-cikl.), lakton	Prirodni proizvod
15	Tamoksifen	10540-29-1	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Steroid, nefenolni	Prirodni proizvod
17	Bisfenol A	80-05-7	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Fenol	Kemijski međuproizvod
18	4-*n*-heptilfenol	1987-50-4	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Daje dvosmislen odgovor ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuproizvod

▼M8

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERI-jev test		Kemijski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (halogenirani)	Pesticid
20	Benz(a)antracen	56-55-3	*Kemikalija koja se ne veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže ([b])	Aromatični ugljikovodik	Međuproizvod
21	Enterolakton	78473-71-9	*Kemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Fitoestrogen	Prirodni proizvod
22	Progesteron	57-83-0	*Kemikalija koja se ne veže* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
23	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	*Kemikalija koja se ne veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže	Silan	Modifikator površine
24	Atrazin	1912-24-9	*Kemikalija koja se ne veže* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Heterociklički spoj	Herbicid

(*) Granica topljivosti < 1×10^{-4} M.

(**) Upotreba i razvrstavanje di-*n*-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temeljili su se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

(+) Tijekom validacijske studije di-*n*-butil-ftalat (DBP) ispitivao se kao kodirana ispitivana tvar pri koncentracijama do 10^{-3} M. U tim su uvjetima neki laboratoriji uočili smanjenje vezivanja radioaktivno obilježenog liganda pri najvišoj koncentraciji (10^{-3} M) i/ili nejasno prilagođenu krivulju. U tim je ciklusima DBP razvrstan kao „kemikalija koja daje dvosmislen odgovor" ili kao „kemikalija koja se veže" u tri laboratorija od njih pet koji su upotrebljavali CERI-jev test i u pet laboratorija od njih šest koji su upotrebljavali FW test (vidjeti literaturu pod 2., odjeljke IV.B.3.a,b i VI.A).

([a]) Razvrstavanje nije bilo u skladu s predviđenim razvrstavanjem. Razvrstavanje 4-*n*-heptilfenola kao „kemikalije koja daje dvosmislen odgovor" ili kao „kemikalije koja se ne veže" u tri laboratorija od njih pet dovelo je do prosječnog razvrstavanja kao kemikalije koja daje dvosmislen odgovor. Temeljitijim pregledom otkriveno je da su uzrok tome ograničenja topljivosti kemikalije koja su spriječila nastanak cijele krivulje vezivanja.

([b]) Tijekom validacijske studije benz(a)antracen reklasificiran je kao kemikalija koja se ne veže (tj. negativan je) na temelju objavljene literature koja pokazuje da *in vitro* estrogena aktivnost navedena za tu tvar (16) prvenstveno ovisi o njezinoj metaboličkoj aktivaciji (17)(18). Enzimska metabolička aktivacija tvari ne bi se očekivala u testovima vezivanja na hrER koji ne sadržavaju stanice, kao što je slučaj u ovoj validacijskoj studiji između laboratorija. Stoga je tu tvar ispravno razvrstati kao kemikaliju koja se ne veže ako se upotrebljava u pokusnim uvjetima za FW i CERI-jev test.

▼M8

SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER

Ključne sastavnice testa

14. Ova se ispitna metoda primjenjuje na testove u kojima se upotrebljava estrogenski receptor i primjereno snažan ligand na receptor koji se može upotrijebiti kao marker/obilježivač za test i koji se može istisnuti s povećavajućim koncentracijama ispitivane kemikalije. Testovi vezivanja sadržavaju sljedeće dvije glavne sastavnice: 1. vezivanje do zasićenja i 2. konkurentsko vezivanje. Test vezivanja do zasićenja upotrebljava se za potvrdu specifičnosti i aktivnosti pripreme receptora, dok se pokus konkurentskog vezivanja upotrebljava za procjenu sposobnosti ispitivane kemikalije da se veže na receptor hrER.

Kontrole

15. Treba opisati osnovu za predloženi istodobni referentni estrogen i kontrole. Istodobne kontrole (otapalo (nosač), pozitivne kontrole (kemikalija koja se veže na estrogenski receptor; snažan i slab afinitet), negativne kontrole (kemikalija koja se ne veže)), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uvjetima i osnova su za usporedbe između pokusa; obično su dio kriterija prihvatljivosti za određeni pokus (1.). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: 1. visoku (približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja.

Standardni postupci kontrole kvalitete

16. Treba provesti standardne postupke kontrole kvalitete kako je opisano za svaki test da bi se osigurala stabilnost aktivnih receptora, točne koncentracije kemikalija i održavanja granica tolerancije kroz više ponavljanja i zadržala sposobnost pružanja očekivanih odgovora vezivanja na estrogenske receptore tijekom vremena.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

17. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa provođenjem testova zasićenja kako bi se potvrdile specifičnost i aktivnost pripravka estrogenskog receptora te testova konkurentskog vezivanja s referentnim estrogenom i kontrolama (kemikalije koje se slabo vežu i koje se ne vežu). Laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka s rezultatima za referentni estrogen i kontrole nastale u 3–5 neovisnih pokusa provedenih na različite dane. Ti će pokusi biti osnova za referentni estrogen i prijašnje kontrole za laboratorij te će se upotrebljavati kao djelomična ocjena prihvatljivosti testa za buduće cikluse.

18. Osjetljivost ispitnog sustava potvrdit će se i ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 2. Popis tvari za dokazivanje osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za testove vezivanja na estrogenske receptore (3.). Te su tvari komercijalno dostupne, čine razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću vezivanja na estrogenski receptor, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za kemikalije koje se vežu (tj. slabe do jake) i koje se ne vežu na estrogenski receptor (tj. negativne). Ispitane koncentracije svake tvari za dokazivanje osposobljenosti trebaju obuhvaćati raspon naveden u tablici 2. Za svaku tvar treba provesti najmanje tri pokusa i rezultati trebaju biti u skladu s očekivanom aktivnošću kemikalije. Svaki pokus treba provesti neovisno (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa), s tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba provesti ispitivanje osposobljenosti.

▼M8

Tablica 2.

Popis kontrola i tvari za dokazivanje osposobljenosti za testove konkurentskog vezivanja na hrER ([1])

Br.	Naziv tvari	CAS br. ([2])	Predviđeni odgovor ([3]) ([4])	Raspon ispitne koncentracije (M)	Kemijski razred prema MeSH-u ([5])	Razred proizvoda ([6])
Kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel (ili) noretindron	68-23-5 (ili) 68-22-4	Kemikalija koja se veže	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silan	Modifikator površine
Tvari za dokazivanje osposobljenosti ([6])						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Tamoksifen	10540-29-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, flavonoid	Prirodni proizvod
9	Bisfenol A	80-05-7	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuproizvod
10	Zearalenon	17924-92-4	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, lakton	Prirodni proizvod

▼M8

Br.	Naziv tvari	CAS br. ([2])	Predviđeni odgovor ([3]) ([4])	Raspon ispitne koncentracije (M)	Kemijski razred prema MeSH-u ([5])	Razred proizvoda ([6])
11	Butil paraben	94-26-8	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karboksilna kiselina, fenol	Konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterociklički spoj	Herbicid
13	Di-*n*-butil-ftalat (DBP) ([7])	84-74-2	Kemikalija koja se ne veže ([8])	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijski međuproizvod
14	Kortikosteron	50-22-6	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Prirodni proizvod

([1]) Ako tvar za dokazivanje osposobljenosti više nije komercijalno dostupna, može se upotrijebiti tvar koja je razvrstana na isti način u pogledu vezivanja na estrogenske receptore, usporedive je jakosti te je iz istog kemijskog razreda.

([2]) Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

([3]) Razvrstavanje kao kemikalija koja se veže na ERαα ili se ne veže na njega tijekom validacijske studije za CERI-jev i FW test vezivanja na hrER (2.).

([4]) Aktivnost vezivanja na estrogenski receptore temeljila se na ICCVAM-ovu Osnovnom dokumentu za preispitivanje (BRD) za testove vezivanja estrogenskog receptora i transaktivacije (9.) te empirijskim podacima i drugim informacijama dobivenima iz studija na koje se upućuje i koje su objavljene i pregledane (10., 11., 12., 13., 14. i 15.).

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

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

([7]) DBP se može upotrebljavati kao zamjenska kontrolna kemikalija koja se ne veže, s najvećom koncentracijom od 10^{-4} M.

([8]) Granica topljivosti za tu tvar iznosi 10^{-4} M. Upotreba i razvrstavanje di-*n*-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temelje se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

▼M8

Ispitivanje topljivosti i utvrđivanje raspona koncentracija za ispitivane kemikalije

19. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u testu. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija ispitana u testu ne bi trebala biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

20. Prihvaćanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja temelji se na procjeni rezultata dobivenih za referentni estrogen i kontrolu koji se koriste za svaki pokus. Prvo, kod ploče 1 cijele krivulje koncentracija referentne kontrole iz svakog pokusa trebaju zadovoljiti mjerila uspješnosti s pomoću parametara prilagođene krivulje (npr. IC_{50} i Hillov nagib) na temelju rezultata navedenih za odgovarajuće protokole za CERI-jev i FW test (dodaci 2. i 3.) i prijašnjih kontrolnih podataka laboratorija koji provodi test. Sve kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže i kemikalija koja se ne veže) treba točno razvrstati za svaki pokus. Kontrole na svim kasnijim pločama zatim treba procijeniti u pogledu dosljednosti s pločom 1. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh krivulje konkurentskog vezivanja. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neovisna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Sposobnost dosljedne provedbe testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze prijašnjih podataka za referentni estrogen i kontrole. Kao mjera obnovljivosti unutar jednog laboratorija mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krivulja referentnog estrogena i kontrolne kemikalije koja se slabo veže. Pri pregledu rezultata kontrole na ploči iz svakog ciklusa te za svaku ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu.

Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterija prihvatljivosti:

— podaci bi trebali biti dovoljni za kvantitativnu procjenu vezivanja na estrogenske receptore,

— ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivane kemikalije.

Analiza podataka

21. Utvrđeni postupak analize podataka o vezivanju do zasićenja i konkurentskom vezivanju treba ispunjavati ključna načela za opis interakcija receptora i liganda. Podaci o vezivanju do zasićenja obično se analiziraju upotrebom modela nelinearne regresije kojim se uzimaju u obzir ukupno i nespecifično vezivanje. Pri utvrđivanju vrijednosti Bmax i Kd možda će biti potreban ispravak potrošnje liganada (npr. Swillens, 1995. (19.)). Podaci iz testova konkurentskog vezivanja obično se transformiraju (npr. postotak specifičnog vezivanja i koncentracija ispitivane kemikalije (log M)). Procjene za log

▼M8

(IC_{50}) za svaku ispitivanu kemikaliju treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra. Nakon početne analize treba izvršiti pregled parametara prilagođene krivulje i izvršiti vizualni pregled mjere u kojoj podaci o vezivanju odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja. U nekim slučajevima može biti potrebna dodatna analiza kako bi se dobila najbolje prilagođena krivulja (npr. ograničavanje vrha i/ili dna krivulje, upotreba pravila od 10 %; vidjeti Dodatak 4. i literaturu pod 2. (odjeljak III.A.2.)).

22. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 20.) znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni test dati točne podatke. Ponavljanje točnih rezultata prvog testa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

23. Trenutačno ne postoji općeprihvaćena metoda za tumačenje podataka o vezivanju na estrogenske receptore. Međutim, i kvalitativne (npr. kemikalija koja se veže/ne veže) i/ili kvantitativne (npr. IC_{50}, relativni afinitet vezivanja (RBA) itd.) procjene aktivnosti posredovane hrER-om trebaju se temeljiti na empirijskim podacima i valjanoj znanstvenoj prosudbi.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

— korišteni test.

Kontrolna/referentna/ispitivana kemikalija:

— izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu ako su poznate,

— prema potrebi, mjerenja pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloga u mediju za uzgoj kulture kojem je dodana ispitivana kemikalija.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

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

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

▼**M8**

Otapalo/nosač:

— karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),

— obrazloženje za odabir otapala/nosača,

— topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Receptori:

— izvor receptora (dobavljač, kataloški broj, serija, vrste receptora, koncentracija aktivnih receptora koju je naveo dobavljač, potvrda dobavljača),

— opis receptora (uključujući rezultate vezivanja do zasićenja): Kd, Bmax,

— skladištenje receptora,

— radioaktivno obilježeni ligand,

— dobavljač, kataloški broj, serija, specifična aktivnost.

Ispitni uvjeti:

— ograničenja topljivosti u uvjetima testa,

— sastav pufera za vezivanje,

— koncentracija receptora,

— koncentracija obilježivača (tj. radioaktivno obilježenog liganda),

— koncentracije ispitivane kemikalije,

— postotak nosača u konačnom testu,

— temperatura i vrijeme inkubacije,

— metoda odvajanja vezanih/slobodnih tvari,

— pozitivne i negativne kontrole/referentne tvari,

— kriteriji na temelju kojih se test smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

— stvarne vrijednosti IC_{50} i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne tvari.

Rezultati:

— neobrađeni podaci i podaci o vezanim/slobodnim tvarima,

— ako je primjereno, provjera radi potvrde denaturiranja,

— ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC),

— vrijednosti RBA i/ili IC_{50}, ako je primjereno,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

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

▼**M8**

Rasprava o rezultatima:

— primjena pravila od 10 %.

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

4. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

5. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20.–6.

6. Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): str. 1073.–89.

7. Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): str. 63.–6.

8. Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293.–342.

9. ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

10. ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

11. ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

12. Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225.–231.

13. OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

▼**M8**

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, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58.–67.

18. Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835.–848.

19. Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197.–1203.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

Pravilo od 10 %: opcija da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [^{3}H]17β-estradiola za 10 % ili više iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 4.).

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

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

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

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV: koeficijent varijacije.

E2: 17β-estradiol.

ED: endokrina disrupcija.

hERα: ljudski estrogenski receptor alfa.

ER: estrogenski receptor.

Estrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da oponaša 17β-estradiol u pogledu sposobnosti da se veže na estrogenske receptore. Ovom se ispitnom metodom može otkriti vezivanje na receptor hERα.

IC_{50}: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

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

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

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

▼M8

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

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

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

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

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

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

Referentni estrogen: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentne ispitne metode: testovi na kojima se temelji PBTG 493.

RBA: relativni afinitet vezivanja. RBA tvari računa se kao postotak log (IC_{50}) za tvar u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol.

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

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

SD: standardna devijacija.

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

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

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

▼**M8**

Dodatak 2.

FREYBERGER-WILSONOVI IN VITRO TESTOVI VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ERA) DO ZASIĆENJA I KONKURENTSKOG VEZIVANJA UPOTREBOM CIJELOG REKOMBINANTNOG RECEPTORA ERA

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ERα) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se cijeli ljudski receptor ERαα(hrERα) koji se proizvodi i izolira iz stanica kukaca zaraženih bakulovirusom. Protokol koji su razvili Freyberger i Wilson podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) i ona je pokaza njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.

2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na cijeli receptor hrERα. Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17β-estradiolom u vezivanju na hrERα. Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC_{50} (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija za hrERα u usporedbi sa 17β-estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrERα, koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.

3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.

4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPĆI UVOD**” i „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrERα mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.

6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.

7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).

▼M8

8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s [^{3}H]17β-estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [^{3}H]17β-estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija" ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [^{3}H]17β-estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrERα

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrERα treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:

— provedbi testa vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrERα. Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola na receptor hrERα (Kd) i broj receptora (Bmax) za svaku šaržu receptora hrERα,

— provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17β-estradiol)), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i drugih relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među različitim šaržama receptora hrERα. Parametri krivulja konkurentskog vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su određena na temelju podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1.

Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, FW test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost [a]	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od95 % [b]	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillov nagib	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	–8,92 ()	0,18 (67)	–8,97	–8,88

▼M8

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost [a]	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od95 % [b]	
				Donja granica	Gornja granica
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov nagib	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindron[c]	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov nagib	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	LogIC_{50} (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

([a]) Srednja vrijednost (n) ± standardna devijacija (SD) izračunani su na temelju procjena parametara prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

([b]) Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

([c]) U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4. (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4). Stoga su srednje vrijednosti ± standardne devijacije (n) izračunane na temelju procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija.
Raspon za IC_{50} ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivno obilježenog liganda upotrijebljenoj u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC_{50} na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

10. Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrERα)

11. Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.

12. Nominalne koncentracije od 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i sa (nespecifično vezivanje) 1 μM neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 20 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom nominalnom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,5 nM često će ispunjavati taj uvjet.

▼M8

13. Ako se kriterij od 20 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 20 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora pa treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [^{3}H]17β-estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):

— bez neobilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Tako se utvrđuje ukupno vezivanje mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [^{3}H]17β-estradiol,

— u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17β-estradiola koja je 1 000 veća od koncentracije obilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Svrha je ovog uvjeta zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17β-estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao a koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru,

— bez neobilježenog 17β-estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [^{3}H]-17β-estradiola i neobilježenog 17β-estradiola

15. Razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola trebaju se pripremiti dodavanjem testnog pufera u glavnu otopinu [^{3}H]-17β-estradiola od 12 nM kako bi se dobile koncentracije koje su prvotno u rasponu od 0,12 nM do 12 nM. Dodavanjem 40 µl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 µl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3,0 nM. Priprema testnog pufera, glavne otopine [^{3}H]-17β-estradiola i razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija podrobno su opisani u protokolu za FW test (2.).

16. Razrjeđivanja etanolskih otopina 17β-estradiola treba pripremiti dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvo u rasponu od 0,06 µM do 6 µM. Dodavanjem 80 µl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 µl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3 µM. Konačna koncentracija neobilježenog 17β-estradiola u pojedinačnim testnim jažicama za nespecifično vezivanje treba biti 1 000 puta veća od koncentracije obilježenog [^{3}H]-17β-estradiola. Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17β-estradiola podrobno je opisana u protokolu za FW test (2.).

17. Treba upotrebljavati nominalnu koncentraciju receptora koja rezultira specifičnim vezivanjem od 20 ± 5 % (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrERα treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., pufera i receptora na pločama naveden je u Dodatku 2.2.

▼M8

Tablica 2.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
ER: estrogenski receptor
E2: neobilježenog 17β-estradiola

19. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Mjerenje [^{3}H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol koji se vezao na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 80 μl hladne suspenzije DCC-a svakoj jažici, protresanjem mikrotitacijskih ploča deset minuta i centrifugiranjem tijekom deset minuta pri približno 2 500 o/min. Kako bi se tijekom tog procesa smanjila disocijacija vezanog [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα, vrlo je važno da se puferi i testne jažice drže na temperaturi od 2 do 8 °C i da se svaki korak provede brzo. Potrebna je jedinica za miješanje za mikrotitracijske ploče kako bi se ploče obradile učinkovito i brzo.

21. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 μl supernatanta koji sadržava [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERα kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i treba ga staviti na drugu mikrotitracijsku ploču.

22. Zatim u svaku jažicu treba dodati 200 μl scintilacijske tekućine, koja može pretvoriti kinetičku energiju nuklearnih emisija u svjetlosnu energiju (A1–B12 i D1–E12). Jažice G1–H12 (utvrđene kao ukupni dpm) predstavljaju serijska razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola (40 μl) koja treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama ploče za mjerenje, kako je navedeno u tablici 3., tj. te jažice sadržavaju samo 200 μl scintilacijske tekućine i odgovarajuće razrjeđivanje [^{3}H]-17β-estradiola. Te mjere pokazuju koliko je [^{3}H]-17β-estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

▼M8

Tablica 3.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja, mjerenje radioaktivnosti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2(ukupno dpm)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Ukupno dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
ER: estrogenski receptor
E2: neobilježeni 17β-estradiol
dpm: raspadi u minuti
(*) Serijska razrjeđivanja radioaktivno obilježenog [^{3}H] estradiola ovdje treba izravno dodati u 200 μl scintilacijske tekućine u jažicama G1–H12.

23. Mjerenje treba započeti s odgodom od najmanje dva sata i vrijeme brojenja treba iznositi 40 minuta po jažici. Kako bi se utvrdio dpm po jažici, treba upotrijebiti scintilacijski brojač za mikrotitracijske ploče s ispravkom za gašenje. Umjesto toga, ako nije dostupan scintilacijski brojač za mikrotitracijsku ploču, uzorci se mogu mjeriti uobičajenim brojačem. U tim uvjetima treba razmotriti smanjenje vremena brojenja.

Test konkurentskog vezivanja

24. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu kemikaliju treba provesti tri istodobna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

25. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u triplikatima; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, najmanje u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, kontrola, [^{3}H]-17β-estradiola, receptora hrERα i otopina ispitivanih kemikalija opisani su u literaturi pod 2. (Prilog K, vidjeti protokol za test FW).

▼**M8**

Kontrola s otapalom:

26. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo etanol. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u etanolu, može se upotrijebiti DMSO. Koncentracija etanola ili DMSO-a, ako se upotrebljavaju, u konačnim testnim jažicama iznosi 1,5 % i ne smije biti veća od 2 %.

Kontrola s puferom

27. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitivanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

28. Endogeni je ligand 17β-estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom na estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrERα treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobiljeeni 17β-estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17β-estradiola u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 100 nM do 10 pM (od –7[logM] do –11[logM]), raspoređeno na sljedeći način: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Najviša koncentracija neobilježenog 17β-estradiola (1 μM) služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona isto dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

29. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 3 nM do 30 pM (od –8,5[logM] do –4,5[logM]), raspoređeno na sljedeći način: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Kemikalija koja se ne veže

30. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2 943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti kada se ispitivane kemikalije ne vežu na receptor hrERα. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 0,1 nM do 1 000 μM (od –10[logM] do –3[logM]), u log povećanjima. Kao alternativna kontrolna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-*n*-butil-ftalat (DBP). Pokazalo se da je njegova najveća topljivost –4[logM].

Koncentracija receptora hrERα

31. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od 20 ± 5 % 1 nM radioaktivno obilježenog liganda (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 2.). Otopinu receptora hrERα treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

[^{3}H]-17β-estradiol

32. Koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u testnim jažicama treba biti 1,0 nM.

▼M8

Ispitivane kemikalije

33. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Test za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35.). Ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom krivulja s osam raspoređenih log koncentracija, kako se utvrdi u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

34. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 26. Dodatka 2.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

35. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.

36. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju log(IC_{50}) ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja (tj. polovine log jedinica oko očekivane vrijednosti log(IC_{50}). Konačni rezultat treba odražavati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane log(IC_{50}), uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

37. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti razmatrajući inkubacije u šest ponavljanja sa šiframa za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB) i kontrole s puferom te uzimajući u obzir inkubacije u tri ponavljanja sa šiframa za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen, osam razina koncentracije kemikalije koja se slabo veže i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda dijagrama ploče za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivanu kemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: 1. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 2.3. Koncentracije navedene u tablicama

▼M8

4. i 5. konačne su koncentracije testa. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 4.

Raspored na mikrotitracijskoj ploča za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slijepa proba (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slijepa proba (za radioakt.) (**)			Slijepa proba (za radioakt.) (**)			Kontrola s puferom			Kontrola s puferom		

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)
(*) Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.
(**) Slijepa proba ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija ispitivane kemikalije i kontrola na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

▼M8

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

38. Kako je prikazano u tablici 6., u jažice treba dodati 80 µl kontrole s otapalom, kontrole s puferom, referentnog estrogena, kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže i ispitivanih kemikalija pripremljenih u testnom puferu. Zatim u svaku jažicu treba dodati 40 µl otopine 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola. Nakon lagane rotacije od 10 do 15 minuta na temperaturi od 2 do 8 °C, treba dodati 40 µl otopine receptora hrERα. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Tablica 6.

Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

Volumen (µl)	Sastojak
80	Neobilježeni 17β-estradiol, noretinodrel, OTES, ispitivane kemikalije, otapalo ili pufer
40	otopina 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola
40	otopina hrERα, koncentracija kako je utvrđena
160	***Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici***

39. Zatim treba kvantificirati [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα, nakon odvajanja [^{3}H]-17β-estradiola vezanog na receptore hrERα od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 80 µl suspenzije hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 20. do 23. za test vezivanja do zasićenja.

40. Jažice H1–6 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm radioaktivno obilježenog [^{3}H] estradiola u 40 µl. Alikvot od 40 µl treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama H1–H6.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

41. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.

42. Specifično vezivanje pri 1 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 15 % do 25 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.

43. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.

44. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti < 35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjeri vrlo niski dpm za najniže koncentracije ispitanog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

▼**M8**

Test konkurentskog vezivanja

45. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [^{3}H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.

46. Vrijednost IC_{50} za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola uvećanoj za Kd utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.

47. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 20 ± 5 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 1 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.

48. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.

49. Kemikalija koje se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).

50. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije FW testa vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost (n) +/– standardnu devijaciju za sve kontrolne cikluse u svim laboratorijima koji sudjeluju u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib, logIC_{50}) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za log10RBA kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen te se navode kao kriteriji uspješnosti za pozitivne kontrole. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati ovisno o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji liganda.

51. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentske krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerama uspješnosti koje su navedene za ovaj FW test i biti dosljedne prijašnjim podacima o kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

▼M8

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

52. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^{3}H]-17β-estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.

53. Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju upotrebom pretpostavke da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak potrošnje liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

54. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini vrijednost IC_{50}.

55. Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak potrošnje liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC_{50}) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom mjera uspješnosti testa iz stavaka od 45. do 50. u ovom Dodatku 2.

56. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu (vidjeti prethodni stavak 55.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa.

▼M8

Tumačenje podataka

57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, a najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 % (slika 1.).

58. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:

— ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili

— ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.

59. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

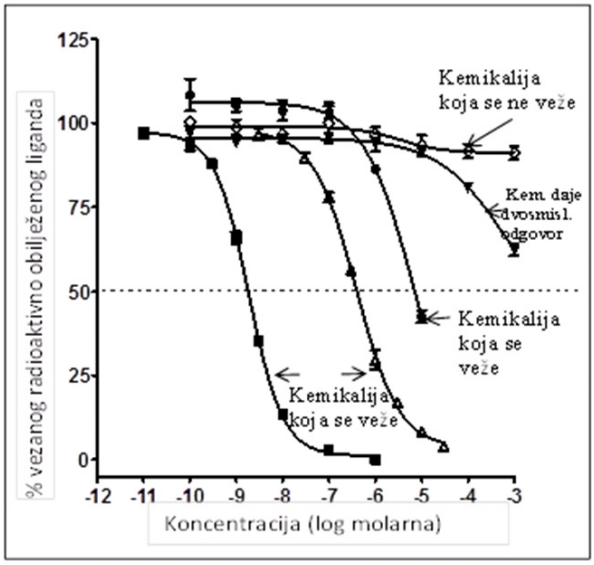
Tablica 7.

Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže[a]	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. **Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.**
Kemikalija koja se ne veže[b]	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, **najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %**. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, **najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %.**
Daje dvosmislen odgovor[c]	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1.

Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja



▼M8

60. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8.

Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Razvrstavanje	**Brojčana vrijednost**
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0
Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Razvrstavanje	**Brojčana vrijednost**
Kemikalija koja se veže	Prosječno $\geq$ 1,5
Daje dvosmislen odgovor	0,5 $\leq$ prosječno < 1,5
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno < 0,5

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode.

▼**M8**

Dodatak 2.1.

POPIS TERMINA

[^{3}H]E2: 17β-estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17β-estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM trisa, 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina, 2 mM DTT-a, 10-postotnoga glicerola, 0,2 mM leupeptina, pH-vrijednost od 7,5.

hrERα: ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa.

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrERα (odnosno ukupni [^{3}H]-17β-estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na receptore hrERα, nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

▼**M8**

Dodatak 2.2.

UOBIČAJENI TEST ZASIĆENJA S [^{3}H]-17B-ESTRADIOLOM S TRI JAŽICE S PONAVLJANJEM

Uobičajeni test zasićenja s [^{3}H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen neobilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen pufera (µl)	Volumen receptora (µl)	Ukupni volumen u jažicama
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

▼**M8**

Uobičajeni test zasićenja s [^{3}H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen neobilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen pufera (µl)	Volumen receptora (µl)	Ukupni volumen u jažicama
B9	3	H	4,00	40	1,00	——	——	——	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	——	——	——	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	——	——	——	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	——	——	——	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	——	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	——	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	——	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	——	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	——	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	——	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	——	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	——	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	——	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	——	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	——	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	——	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	——	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	——	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	——	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	——	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	——	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	——	40	160

▼**M8**

Uobičajeni test zasićenja s [^{3}H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen neobilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen pufera (µl)	Volumen receptora (µl)	Ukupni volumen u jažicama
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	radioakt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40
G2	2	radioakt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40
G3	3	radioakt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40
G4	1	radioakt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G5	2	radioakt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G6	3	radioakt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G7	1	radioakt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G8	2	radioakt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G9	3	radioakt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G10	1	radioakt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40
G11	2	radioakt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40
G12	3	radioakt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40

▼**M8**

Uobičajeni test zasićenja s [^{3}H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen neobilježenog E2 (µl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (µM)	Volumen pufera (µl)	Volumen receptora (µl)	Ukupni volumen u jažicama
H1	1	radioakt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40
H2	2	radioakt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40
H3	3	radioakt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40
H4	1	radioakt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H5	2	radioakt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H6	3	radioakt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H7	1	radioakt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H8	2	radioakt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H9	3	radioakt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H10	1	radioakt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40
H11	2	radioakt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40
H12	3	radioakt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 µl samo za brojenje scintilacijom.

▼**M8**

Dodatak 2.3.

RASPORED JAŽICA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
S	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
S	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
S	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
S	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
S	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
S	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	B5	2	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	C9	3	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	slijepa proba	slij. proba	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slijepa proba	slij. proba	B2	–	–	160	–	–	160	–
S	C12	3	slijepa proba	slij. proba	B3	–	–	160	–	–	160	–
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	H1	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H2	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H3	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H4	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H5	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H6	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H7	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H8	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H9	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H10	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H11	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H12	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 µl samo za brojenje scintilacijom.

▼M8

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–
P1	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja												
Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	C1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja												
Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	E1	1	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	ispit. kemikalija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	ispit. kemikalija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	ispit. kemikalija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	ispit. kemikalija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	ispit. kemikalija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	ispit. kemikalija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	ispit. kemikalija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	ispit. kemikalija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	G1	1	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	ispit. kemikalija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	ispit. kemikalija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	ispit. kemikalija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	ispit. kemikalija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neobilježeni E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neobilježeni E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neobilježeni E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neobilježeni E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neobilježeni E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neobilježeni E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Dodatak 3.

IN VITRO TEST VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR UPOTREBOM LJUDSKOG REKOMBINANTNOG PROTEINA DOMENE VEZIVANJA LIGANDA RECEPTORA ERA KOJI JE RAZVIO CERI (INSTITUT ZA PROCJENU I ISTRAŽIVANJE KEMIKALIJA)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ERα) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se domena vezivanja liganda (LBD) ljudskog receptora ERα (hrERα). Taj konstrukt proteina proizveo je CERI (institut za procjenu i istraživanje kemikalija) iz Japana te on postoji kao fuzijski protein glutation S-transferaza (GST) i eksprimira se u bakteriji E. coli. CERI-jev protokol podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) koja je pokaza njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.

2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na receptor hrERα. Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17β-estradiolom u vezivanju na domenu vezivanja liganda receptora hrERα. Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC_{50} (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija na hrERα u usporedbi sa 17β-estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrERα, koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.

3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.

4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPĆI UVOD**” i „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrERα mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.

6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.

▼M8

7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).

8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s [^{3}H]17β-estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [^{3}H]17β-estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija" ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [^{3}H]17β-estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrERα

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrERα treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:

— provedbi testa vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrERα. Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola na receptor hrERα (Kd) i broj receptora (Bmax) za određenu šaržu receptora hrERα,

— provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17β-estradiol), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES)). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među različitim šaržama receptora hrERα. Osim toga, parametri krivulja konkurentskog vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su razvijena upotrebom podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1

Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, CERI-jev test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost [a]	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % [b]	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost [a]	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % [b]	
				Donja granica	Gornja granica
	Hillov nagib	– 1,22	0,20 (70)	– 1,27	– 1,17
	$LogIC_{50}$	– 8,93	0,23 (70)	– 8,98	– 8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov nagib	– 1,04	0,21 (68)	– 1,09	– 0,99
	$LogIC_{50}$	– 6,19	0,40 (68)	– 6,29	– 6,10
Noretindron [c]	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov nagib	– 1,18	0,32 (23)	– 1,31	– 1,04
	$LogIC_{50}$	– 6,01	0,54 (23)	– 6,25	– 5,78

[a] Srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) s veličinom uzorka (n) izračunani su upotrebom procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

[b] Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

[c] U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4 (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4.). Stoga su srednje vrijednosti ± standardne devijacije (n) izračunane upotrebom procjena prilagodbe krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija.
Raspon za IC_{50} ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivno obilježenih liganada u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC_{50} na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

10. Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrERα)

11. Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.

12. Nominalne koncentracije od 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i s (nespecifično vezivanje) 1 μM neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 0,5 nM [^{3}H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i

▼M8

nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 40 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,2 nM često će ispunjavati taj uvjet.

13. Ako se kriterij od 40 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 40 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora i zatim treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [^{3}H]17β-estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):

a. bez neobilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. To je utvrđivanje ukupnog vezivanja mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [^{3}H]17β-estradiol;

b. u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17β-estradiola koja je 2000 veća od koncentracije obilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Namjera je ovog uvjeta zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17β-estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru;

c. bez neobilježenog 17β-estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [^{3}H]-17β-estradiola, neobilježenog 17β-estradiola i receptora hrERα

15. Otopinu 40 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba pripremiti iz 1 μM glavne otopine [^{3}H]-17β-estradiola u DMSO-u, dodavanjem DMSO-a (kako bi se pripremilo 200 nM) i testnog pufera na sobnoj temperaturi (kako bi se pripremilo 40 nM). Upotrebom te otopine od 40 nM priprema se niz razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola, u rasponu od 0,313 nM do 40 nM s testnim puferom na sobnoj temperaturi (kako je prikazano u retku 12 tablice 2.). Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0313 do 4,0 nM, dobit će se dodavanjem 10 μl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema testnog pufera, izračun izvorne glavne otopine [^{3}H]-17β-estradiola na temelju njezine specifične aktivnosti, priprema razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija podrobno su opisani u protokolu za CERI-jev test (2.).

16. Razrjeđivanja neobilježenih otopina 17β-estradiola treba pripremiti iz 1 nM glavne otopine 17β-estradiola dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvotno u rasponu od 0,625 μM do 80 μM. Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0625 do 8 μM, dobit će se dodavanjem 10 μl tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica namijenjenima za mjerenje nespecifičnog vezivanja (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17β-estradiola podrobno je opisana u protokolu za CERI-jev test (2.).

▼**M8**

17. Treba upotrebljavati koncentraciju receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 % (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrERα treba pripremiti s vrlo hladnim testnim puferom neposredno prije upotrebe, tj. nakon što se pripreme sve jažice za ukupno vezivanje, nespecifično vezivanje i samo radioaktivno obilježeni ligand.

18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., s tri ponavljanja po koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola. Raspored volumena [^{3}H]-17β-estradiola, neobilježenog 17β-estradiola, pufera i receptora prikazan je u tablici 3.

Tablica 2

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Za mjerenje TB-a			Za mjerenje NSB-a			Za utvrđivanje samo radioaktivno obilježenog liganda				Razrjeđivanja neobilježenog E2 za stupce ploče 4–6	Razrjeđivanja [^{3}H]E2 za stupce ploče 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: ukupno vezivanje
NSB: nespecifično vezivanje
[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiol
E2: neobilježeni 17β-estradiol
(*) Koncentracije koje su ovdje navedene konačne su koncentracije u svakoj jažici.
(**) Razrjeđivanja neobilježenog E2 i [^{3}H]E2 mogu se pripremiti na različitim pločama.

▼M8

Tablica 3

Volumeni reagensa za mikrotitracijsku ploču za zasićenje

Broj retka		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Koraci pripreme		Jažice za TB			Jažice za NSB			Samo radioaktivno obilježeni ligand		
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redoslijed dodavanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl		
	neobilježeni E2 iz retka 11 u tablici 2.	–			10 µl			–		
	[^{3}H]E2 iz retka 12 u tablici 2.	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Ukupni reakcijski volumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubacija		**REAKCIJA NAKON DVA SATA INKUBACIJE**						Kvantifikacija radioaktivnosti odmah nakon pripreme. Bez inkubacije		
Tretiranje 0,4-postotnim DCC-om		Da			Da			**Ne**		
Volumen 0,4-postotnog DCC-a		100 µl			100 µl			–		
Filtriranje		Da			Da			Ne		
MJERENJE DPMS-a										
Kvantifikacijski volumen dodan scintilacijskom koktelu		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ako se za mjerenje raspada u minuti upotrebljava tekućinski scintilacijski brojač (LSC) za mikrotitracijske ploče, samo radioaktivno obilježeni ligand nije primjereno pripremati na istoj testnoj ploči na kojoj se nalaze i jažice za TB i NSB. Samo radioaktivno obilježeni ligand treba pripremiti na drugoj ploči.

(**) Ako se za odvajanje DCC-a upotrebljava centrifugiranje, LSC-om treba izmjeriti 50 µl supernatanta kako bi se izbjegla kontaminacija DCC-a.

19. Mikrotitracijske ploče testa za utvrđivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 °C do 28 °C).

Mjerenje [^{3}H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

20. Nakon dvosatnog razdoblja inkubacije [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola tako da se u jažice doda 100 µl 0,4-postotne vrlo hladne suspenzije DCC-a. Ploče zatim treba staviti na led deset minuta, a reakcijsku smjesu i suspenziju DCC-a filtrirati prenošenjem na filtar mikrotitracijske ploče kako bi se uklonio DCC. Zatim 100 µl filtrata treba dodati scintilacijskoj tekućini u bočice LSC-a za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) po bočici brojenjem metodom tekućinske scintilacije.

▼M8

21. Umjesto toga, ako nije dostupan mikrotitracijski filtar, DCC se može ukloniti centrifugiranjem. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 µl supernatanta koji sadržava [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERα kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i to se treba upotrijebiti za brojenje scintilacijom.

22. Uvjet sa samo radioaktivno obilježenim ligandom upotrebljava se za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) [^{3}H]-17β-estradiola dodanog u testne jažice. Radioaktivnost treba kvantificirati odmah nakon pripreme. Te jažice ne treba inkubirati ni tretirati suspenzijom DCC-a, već se njihov sadržaj treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini. Te mjere pokazuju koliko je [^{3}H]-17β-estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Test konkurentskog vezivanja

23. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu kemikaliju treba provesti tri neparalelna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

24. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje, tj. približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, [^{3}H]-17β-estradiola, receptora hrERα i otopina ispitivanih kemikalija podrobno su opisani u protokolu za test CERI (2.).

Kontrola s otapalom

25. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo DMSO. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u DMSO-u, može se upotrijebiti etanol. Koncentracija DMSO-a u konačnim testnim jažicama treba biti 2,05 % i može se povećati do 2,5 % ako ispitivana kemikalija nije dovoljno topljiva. Ne treba upotrebljavati koncentracije DMSO-a veće od 2,5 % zbog utjecaja većih koncentracija otapala na test. Za ispitivane kemikalije koje nisu topljive u DMSO-u, ali su topljive u etanolu, u testu se može upotrijebiti najviše 2 % etanola bez interferencije.

Kontrola s puferom

26. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitivanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

▼M8

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

27. Endogeni je ligand 17β-estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom za estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrERα treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17β-estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17β-estradiola u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama koje se trebaju upotrijebiti za standardnu krivulju: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najviša koncentracija neobilježenog 17β-estradiola (1 μM) treba služiti kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona i dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

28. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili alternativno noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} i 10^{-9} M.

Kemikalija koja se ne veže

29. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti ispitivane kemikalije koje se ne vežu na receptor hrERα. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Kao alternativna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-n-butil-ftalat (DBP, CAS 84-72-2), ali se ispituje samo do 10^{-4} M. Pokazalo se da je 10^{-4} M najveća topljivost DBP-a u testu.

Koncentracija receptora hrERα

30. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 % (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 3.). Otopinu receptora hrERα treba pripremiti razrjeđivanjem funkcionalnog receptora hrERα u vrlo hladnom testnom puferu, neposredno prije upotrebe.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Konačna koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u testnim jažicama treba biti 0,5 nM.

Ispitivane kemikalije

32. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona uključuje kontrolu s otapalom i najmanje osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35. Dodatka 3.). Kada se utvrdi raspon koncentracija za ispitivanje, ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom

▼M8

osam primjereno raspoređenih log koncentracija, kako su utvrđene u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Ako je potrebno, koncentracije ispitane u drugom i trećem pokusu po potrebi treba dodatno prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

33. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 25. Dodatka 3.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

34. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.

35. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju log(IC_{50}) ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja bliže očekivanoj vrijednosti log(IC_{50}) (tj. polovine log jedinica). Konačni rezultati trebaju pokazivati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane log(IC_{50}), uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

36. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti upotrebom inkubacija u šest ponavljanja za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena (E2) koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB), kontrole s puferom, te inkubacije u tri ponavljanja za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen (E2), osam koncentracija kemikalije koja se slabo veže (noretinodrel ili noretindron) i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda na ploči za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivanu kemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom (kao ukupno vezivanje) i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom mikrotitracijskih ploča za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 3.3. Koncentracije navedene u radnom listu te u tablicama 4. i 5. odnose se na konačne koncentracije koje se upotrebljavaju u svakoj testnoj jažici. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

▼M8

Tablica 4

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja (1) (2), cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s puferom i pozitivna kontrola (E2)			Slabo pozitivna kemikalija (Noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB i NSB		
A	Slijepa proba (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s otapalom) (2,05-postotni DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ 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 puferom		
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			Slijepa proba (za radioakt.) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Primjer rasporeda za mikrotitracijsku ploču sa standardima koje treba primijeniti u svakom pokusu.
(2) Napominje se da se na ovoj mikrotitracijskoj ploči upotrebljavaju razrjeđivanja pripremljena na ploči za razrjeđivanje opisanoj u pogledu standarda u prethodnim odjeljcima.
U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)
(*) Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.
(**) Slijepa proba, ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, dodatne ploče za ispitivane kemikalije (TC) i kontrole na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ispitivana kemikalija 1 (TC-1)			Ispitivana kemikalija 2 (TC-2)			Ispitivana kemikalija 3 (TC-3)			Kontrole		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s otapalom)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

▼M8

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

37. Uz iznimku jažica za ukupno vezivanje i slijepe probe (za radioaktivnost), kako je prikazano u tablici 6., u svaku jažicu treba staviti 50 µl testnog pufera i pomiješati s 10 µl kontrole s otapalom, referentnog estrogena (E2), kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže ili ispitivanih kemikalija te s 10 µl otopine [^{3}H]-17β-estradiola od 5 nM. Zatim se svakoj ploči dodaje 30 µl vrlo hladne otopine receptora i lagano promiješa. Otopina receptora hrERα trebala bi biti posljednji reagens koji se dodaje. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 do 28 °C).

Tablica 6

Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

Koraci pripreme		Osim jažica za TB	Jažice za TB	Slijepa proba (za radioakt.)
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redoslijed dodavanja	Testni pufer sobne temperature	50 µl	60 µl	90 µl
	Neobilježeni E2, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže, otapalo i ispitivane kemikalije (*)	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiol koji treba imati konačnu koncentraciju od 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Koncentracija receptora hrERα kako je utvrđeno (vidjeti stavke 12. i 13.)	30 µl	30 µl	–
Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Pravilno pripremljeni kako bi se dobila konačna koncentracija u okviru prihvatljive koncentracije otapala

38. Zatim treba kvantificirati [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα, nakon odvajanja [^{3}H]-17β-estradiola vezanog na receptore hrERα od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 100 µl suspenzije vrlo hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 21. do 23. Dodatka 3. za test vezivanja do zasićenja.

39. Jažice G10–12 i H10–12 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm označenog [^{3}H] estradiola u 10 µl. Alikvot od 10 µl treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

40. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.

41. Specifično vezivanje pri 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 30 % do 50 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.

▼M8

42. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.

43. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti <35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjere vrlo niski dpm-ovi za najniže koncentracije ispitanog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

44. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [^{3}H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.

45. Vrijednost IC_{50} za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola uvećanoj za Kd utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.

46. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 40 ± 10 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 0,5 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.

47. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.

48. Kemikalija koja se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).

49. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije za CERI-jev test vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost ±SD (n) svih kontrolnih ciklusa u sva četiri laboratorija koja su sudjelovala u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib, $logIC_{50}$) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za log_{10}RBA kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati ovisno o eksperimentalno izvedenoj vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji liganda upotrijebljenoj u testu.

50. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja)

▼M8

konkurentske krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerilima uspješnosti koja su navedena za ovaj CERI-jev test i biti dosljedne podacima o prijašnjim kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

51. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^{3}H]-17β-estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.

52. Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju uz pretpostavku da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

53. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini vrijednost IC_{50}.

54. Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC_{50}) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa iz stavaka od 44. do 49. ovog Dodatka 3.

▼M8

55. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrole kemikalije koja se slabo veže (vidjeti stavak 54. ovog Dodatka 3.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe između tri ciklusa.

Tumačenje podataka

56. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se krivulja vezivanja može prilagoditi te je najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja od 50 % (slika 1.).

57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:

— ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili

— ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.

58. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Tablica 7

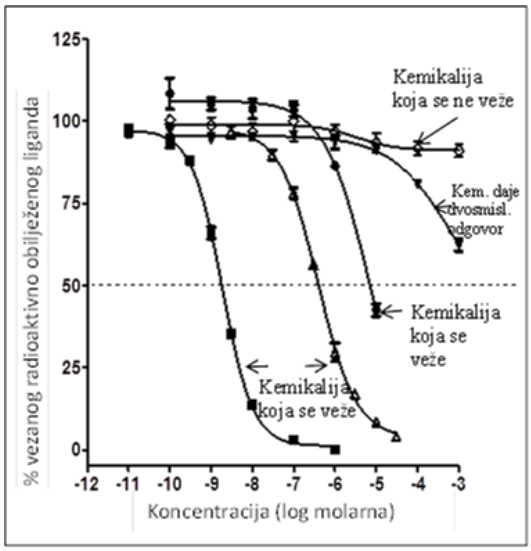
Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže[a]	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. **Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.**
Kemikalija koja se ne veže[b]	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, **najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %**. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, **najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %**.
Daje dvosmislen odgovor[c]	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

▼M8

Slika 1

Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja



59. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8

Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:

Razvrstavanje	**Brojčana vrijednost**
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0

Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:

Razvrstavanje	**Brojčana vrijednost**
Kemikalija koja se veže	Prosječno ≥ 1,5
Daje dvosmislen odgovor	0,5 ≤ prosječno < 1,5
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno < 0,5

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

60. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode.

▼**M8**

Dodatak 3.1.

POPIS TERMINA

[^{3}H]E2: 17β-estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17β-estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM Tris-HCl, pH-vrijednosti 7,4, s 1 mM EDTA-e, 1 mM EGTA-e, 1 mM NaVO3, 10 % glicerola, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditiotreitola i 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina.

hrERα: ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena vezivanja liganda).

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrERα (odnosno ukupni [^{3}H]-17β-estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na receptore hrERα, nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

▼**M8**

Dodatak 3.2.

RASPORED JAŽICA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	slijepa proba	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	slijepa proba	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	slijepa proba	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	G2	2	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DB-P7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	ukupno vezivanje	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	neob. E2 (visoki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	neob. E2 (visoki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	D12	6	neob. E2 (visoki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	kontr. s puferom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	kontr. s puferom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	kontr. s puferom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	kontr. s puferom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	kontr. s puferom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	kontr. s puferom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	sl. proba (za rad.)	radioa-kt.	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	sl. proba (za rad.)	radioa-kt.	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	sl. proba (za rad.)	radioa-kt.	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	sl. proba (za rad.)	radioa-kt.	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	H11 (*)	5	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	H3	3	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A9	3	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	kontr. E2 (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	kontr. E2 (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	kontr. E2 (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC501	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	B11	2	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC502	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC503	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	kontr. NE (max)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	kontr. NE (max)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	kontr. NE (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC501	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC502	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC503	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	neob. E2 (visoki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	neob. E2 (visoki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	neob. E2 (visoki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. s ploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	H10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	ukupno vezivanje	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 10 µl samo za brojenje scintilacijom.

▼M8

Dodatak 4.

RAZMATRANJA ZA ANALIZU PODATAKA IZ TESTA KONKURENTSKOG VEZIVANJA NA hrER

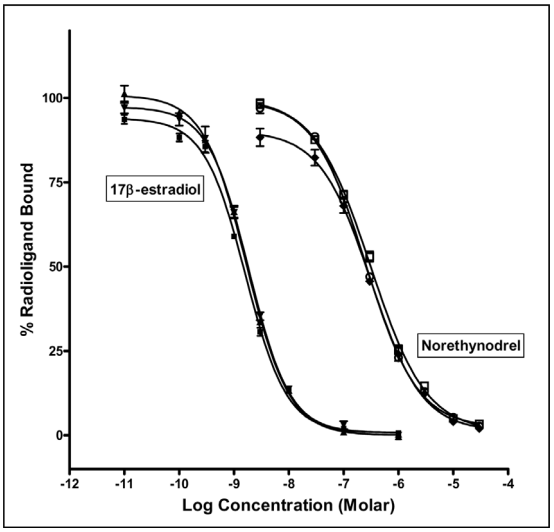
1. Testom konkurentskog vezivanja na hrERα mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini IC_{50}.

Analiza podataka za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže (1.)

2. Podaci iz kontrolnih ciklusa transformiraju se (tj. postotak specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola i log koncentracija kontrolne kemikalije) radi daljnje analize. Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično se mogu ostaviti neograničenima pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Za FW i CERI-jev test nije bio potreban ispravak za potrošnju liganada, ali po potrebi može se razmotriti njegova upotreba. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže može se izračunati kao postotak log (IC_{50}) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole i kontrolu s kemikalijom koja se ne veže treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa i kriterija prihvatljivosti kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi (stavak 20.), Dodatku 2. (FW test, stavci od 41. do 51.) i Dodatku 3. (CERI-jev test, stavci od 41. do 51.). Primjeri tri ciklusa za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže prikazani su na slici 1.

Slika 1.

Primjeri krivulja konkurentskog vezivanja za referentni estrogen i kontrolnu kemikaliju koja se slabo veže



▼M8

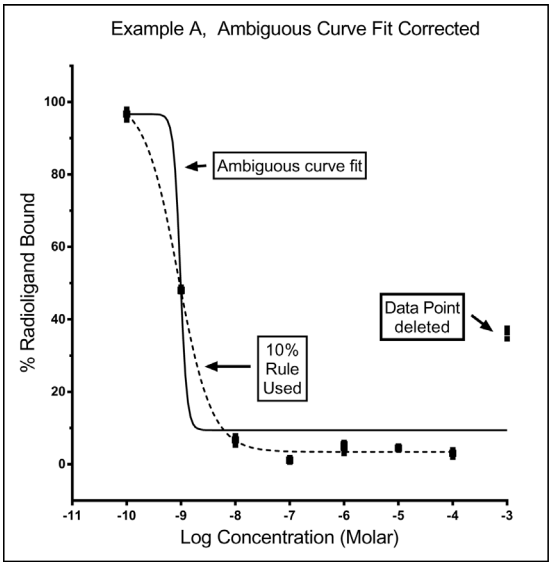
Analiza podataka za ispitivane kemikalije

3. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo treba podvrgnuti standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa. Pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu, a podaci upotrijebljeni za razvrstavanje ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže ili koja se ne veže trebaju biti znanstveno opravdani.

4. Povremeno se mogu pojaviti primjeri podataka za koje je potrebna posebna pozornost kako bi se pravilno analizirali i protumačili podaci o vezivanju na hrER. U prethodnim studijama uočeno je da postoje slučajevi u kojima analiza i tumačenje podataka o konkurentskom vezivanju na receptore mogu biti složeni zbog povećanja postotka specifičnog vezivanja kod ispitivanja kemikalija pri najvišim koncentracijama (slika 2.). To je poznata poteškoća do koje dolazi kod upotrebe protokola za niz testova konkurentskog vezivanja na receptore (3). U tim se slučajevima pri nižim koncentracijama uočava odgovor koji ovisi o koncentraciji, ali kako se koncentracija ispitivane kemikalije približava granici topljivosti prestaje se smanjivati istiskivanje [^{3}H]17β-estradiola. U tim slučajevima podaci za više koncentracije pokazuju da je dosegnuto biološko ograničenje testa. Na primjer, ta je pojava često povezana s netopljivošću kemikalije i taloženjem pri visokim koncentracijama ili može odražavati i prekoračenje sposobnosti ugljena premazanog dekstranom da veže slobodni radioaktivno obilježeni ligand tijekom postupka odvajanja pri najvišim koncentracijama kemikalija. Zadržavanje tih podatkovnih točaka tijekom prilagođavanja podataka o konkurentskom vezivanju u sigmoidnu krivulju ponekad može dovesti do pogrešnog razvrstavanja ispitivane kemikalije u pogledu potencijala vezivanja na estrogenski receptor (slika 2.). Kako bi se to izbjeglo, protokol za FW i CERI-jev test vezivanja na hrER uključuje opciju da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [^{3}H]17β-estradiola za 10 % ili više veća iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (to se obično naziva pravilo od 10 %). Ovo se pravilo može upotrijebiti samo jednom za određenu krivulju i mora ostati dovoljno podataka za najmanje šest koncentracija tako da se krivulju može točno razvrstati.

Slika 2.

Primjeri, krivulje konkurentskog vezivanja s upotrebom pravila od 10 % i bez te upotrebe

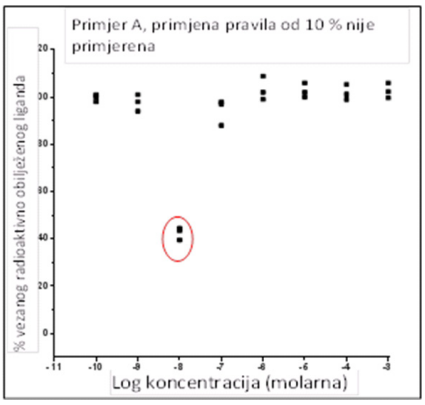


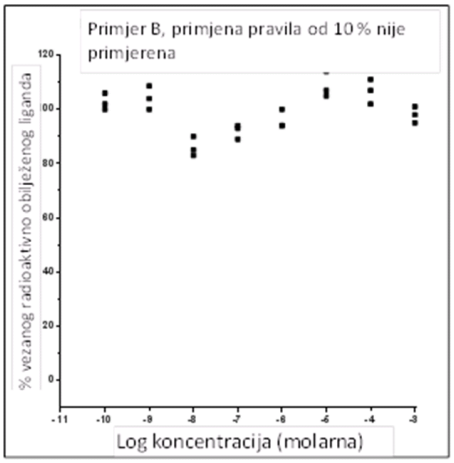
▼**M8**

5. Primjerenu upotrebu pravila od 10 % za ispravak tih krivulja treba pažljivo razmotriti i sačuvati za slučajeve u kojima postoji snažna indikacija da je riječ o kemikaliji koja se veže na receptor hrER. Tijekom provedbe pokusa za validacijsku studiju FW testa vezivanja na hrER uočeno je da pravilo od 10 % ponekad ima neplaniranu i nepredviđenu posljedicu. Kemikalije koje nisu bile u interakciji s receptorom (tj. prave kemikalije koje se ne vežu) često su pokazivale varijabilnost u pogledu 100-postotnog vezivanja radioaktivno označenog liganda koja je bila veća od 10 % u cijelom rasponu ispitanih koncentracija. Ako se najniža vrijednost javila pri niskoj koncentraciji, upotrebom pravila od 10 % iz analize bi se potencijalno mogli izbrisati podaci iz svih viših koncentracija iako bi te koncentracije mogle biti korisne u utvrđivanju toga da se kemikalija ne veže. Na slici 3. prikazani su primjeri slučajeva u kojima upotreba pravila od 10 % nije primjerena.

Slika 3.

Primjeri, podaci o konkurentskom vezivanju gdje nije primjerena upotreba pravila od 10 %





▼**M8**

Referentni dokumenti

1. OECD (2015). *Integrated Summary Report:* Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, str. 187.–191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.

3. Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. Toxicological Sci. 94(1):46.–56.

▼M8

B.71. *IN VITRO* TESTOVI IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE KOJIMA SE ISPITUJE KLJUČNI DOGAĐAJ AKTIVIRANJA DENDRITIČNIH STANICA U PUTU NASTANKA ŠTETNOG ISHODA (AOP) IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE

OPĆI UVOD

Ispitna metoda koja se temelji na ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica

1. Tvar koja izaziva preosjetljivost kože tvar je koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definirana u Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EU) 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u) ([1]). Postoji opća suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o kemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažeto su prikazane u obliku puta nastanka štetnog ishoda (engl. *Adverse Outcome Pathway* – AOP), u okviru OECD-ova programa za AOP (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do štetnog učinka, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa. U ovom je slučaju početni molekularni događaj (tj. prvi ključni događaj) stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih tvari i nukleofilnih središta u proteinima kože. Drugi se ključni događaj u ovom AOP-u odvija u keratinocitima i uključuje upalne odgovore te promjene u genskoj ekspresiji povezane sa specifičnim staničnim signalnim putovima kao što su putovi koji ovise o elementu antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*, ARE). Treći je ključni događaj aktiviranje dendritičnih stanica (DC), koje se obično ocjenjuje prema ekspresiji specifičnih staničnih površinskih biljega, kemokina i citokina. Četvrti je ključni događaj aktiviranje i proliferacija T-stanica, koji se neizravno ocjenjuju analizom lokalnih limfnih čvorova na miševima (LLNA) (3.).

2. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 442E (2017.). U njoj se opisuju *in vitro* analize kojima se ispituju mehanizmi opisani u okviru ključnog događaja aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože (2.). Ispitna metoda sastoji se od ispitivanja koja treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sustavom UN GHS i Uredbom o CLP-u.

U ovoj su ispitnoj metodi opisana sljedeća ispitivanja:

— test aktiviranja ljudske stanične linije (h-CLAT),

— test aktiviranja stanične linije U937 (U-SENS™),

— test reporterskog gena interleukin 8 (test IL-8 Luc).

3. Ispitivanja uključena u ovu ispitnu metodu i odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje mogu se razlikovati u odnosu na postupak koji se upotrebljava za dobivanje podataka i izmjerenih očitanja, ali se mogu neselektivno upotrebljavati za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja o ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

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

▼M8

Kontekst i načela ispitivanja uključenih u ispitnu metodu koja se temelji na ključnom događaju

4. U procjenama izazivanja preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (4.)), ocjenjuje se i faza indukcije i faza elicitacije izazivanja preosjetljivosti kože. Ispitivanjima na miševima, tj. analizom LLNA (ispitna metoda B.42. (3.)) i njezinim dvjema inačicama u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izotopi, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (5.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (6.)), ispituje se isključivo odgovor u fazi indukcije i isto su tako prihvaćene jer omogućuju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja s objektivnim mjerenjem faze indukcije izazivanja preosjetljivosti kože.

5. Nedavno su prihvaćene *in chemico* i *in vitro* ispitne metode koje se temelje na mehanističkom pristupu kojima se ispituje prvi ključni događaj (ispitna metoda B.59.; test izravne reaktivnosti peptida (7.)) i drugi ključni događaj (ispitna metoda B.60.; test luciferaze ARE-Nrf2 (8.)) u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože kako bi se pridonijelo ocjenjivanju potencijala opasnosti kemikalija da izazovu preosjetljivost kože.

6. Ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi kvantificira se promjena u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (npr. CD54, CD86) ili promjene ekspresije IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica. Postoje izvješća o tome da tvari koje izazivaju preosjetljivost kože induciraju ekspresiju staničnih membranskih biljega, kao što su CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86, povrh induciranja proupalnih citokina, kao što su IL-1β i TNF-α, i nekoliko kemokina, uključujući IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9., 10, 11. i 12.), povezanih s aktiviranjem dendritičnih stanica (2.).

7. Međutim, budući da je aktiviranje dendritičnih stanica samo jedan ključni događaj AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože (2. i 13.), informacije dobivene ispitivanjima kojima se mjere samo biljezi aktiviranja dendritičnih stanica možda neće biti dovoljne za donošenje zaključka o prisustvu ili odsustvu potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga se predlaže da podaci dobiveni ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi služe kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože kada se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (IATA), zajedno s ostalim relevantnim dodatnim informacijama, npr. onima dobivenima *in vitro* analizama kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s kemijski analognim tvarima (13.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih ovim ispitivanjima u okviru utvrđenih pristupa, tj. pristupa standardiziranih i u pogledu skupa korištenih izvora informacija i postupka primijenjenog na podatke kako bi se dobila predviđanja, objavljeni su (13.) i mogu se upotrebljavati kao korisni elementi u okviru IATA-e.

8. Ispitivanja opisana u ovoj ispitnoj metodi ne mogu se upotrijebiti kao jedina metoda za razvrstavanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definirane u sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u (u slučaju tijela koja primjenjuju te dvije neobavezne potkategorije) ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, ovisno o regulatornom okviru pozitivni rezultati dobiveni ovim metodama mogu se samostalno upotrijebiti za razvrstavanje kemikalije u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u.

▼M8

9. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje ([1]) te se ne odnosi na primjenjivost ispitivanja na ispitivanje tvari s jednim sastojkom, tvari s više sastojaka i/ili smjesa. Trenutačno su dostupne ograničene informacije o primjenjivosti ispitivanja na tvari s više sastojaka/smjese (14. i 15.). Unatoč tomu, ispitivanja su tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto ([2]). Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Osim toga, kada se ispituju tvari s više sastojaka ili smjese, trebalo bi razmotriti moguću interferenciju citotoksične komponente s uočenim odgovorima.

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupno na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

3. Poglavlje B.42. ovog Priloga: Analiza lokalnih limfnih čvorova.

4. Poglavlje B.6. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože.

5. Poglavlje B.50. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: DA.

6. Poglavlje B.51. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: BrdU-ELISA.

7. Poglavlje B.59. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in chemico*: test izravne reaktivnosti peptida (*Direct Peptide Reactivity Assay* – DPRA).

8. Poglavlje B.60. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in vitro*: test luciferaze ARE-Nrf2.

9. Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271.–96.

10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841.–7.

11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031.–8.

([1]) U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje.

([2]) Ova je rečenica predložena i dogovorena na sastanku o WNT-u održanom u travnju 2014.

▼**M8**

12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390.–8.

13. OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: https://community.oecd.org/community/iatass.

14. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275.–284.

15. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901.–916.

▼M8

Dodatak 1.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE IN VITRO: TEST AKTIVIRANJA LJUDSKE STANIČNE LINIJE (H-CLAT)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Testom h-CLAT kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86 i CD54) kod ljudske stanične linije monocitne leukemije THP-1 nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1. i 2.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 i CD54 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože.

2. Test h-CLAT ocijenjen je u validacijskoj studiji kojom je koordinirao Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) i kasnijem neovisnom stručnom pregledu koji je proveo EURL ECVAM-ov Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM preporučio je da se test h-CLAT (3.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom h-CLAT u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 11.).

3. Pokazalo se da se test h-CLAT može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija biti reda veličine 80 % (3. i 12.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (13.) i drugim objavljenim studijama (14.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 85 % (N = 142), uz osjetljivost od 93 % (94/101) i specifičnost od 66 % (27/41) (na temelju ponovne analize EURL ECVAM-a (12.), uzimajući u obzir sve postojeće podatke i ne uzimajući u obzir negativne rezultate za kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5, kako je opisano u stavku 4.). Veća je vjerojatnost da će se testom h-CLAT dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (4., 13. i 15.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost metode h-CLAT kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode h-CLAT kao samostalnog testa samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se metoda h-CLAT može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (3., 14. i 15.). Metoda h-CLAT primjenjiva je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 14.) Ispitivane kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5 obično daju lažno negativne rezultate (14.). Stoga negativne rezultate s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ne treba razmatrati. Međutim, pozitivni rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ipak se mogu upotrijebiti kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja izaziva

▼M8

preosjetljivost kože. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti upotrijebljene stanične linije (16.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom), posebno oni sa sporom stopom oksidacije, isto tako mogu dati negativne rezultate u testu h-CLAT (15.). Testom h-CLAT mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (17.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om ili propidijeva jodida. U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om (vidjeti stavak 24.) ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti u Dodatku 1.2. S obzirom na navedeno, negativne rezultate trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se metoda h-CLAT ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, tu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

5. Kao što je opisano, metoda h-CLAT pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogla bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (4., 5. i 9.). Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni metodom h-CLAT mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.

6. Definicije su navedene u Dodatku 1.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Metoda h-CLAT je *in vitro* analiza kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega (tj. CD86 i CD54) na ljudskoj staničnoj liniji monocitne leukemije, stanicama THP-1, nakon 24-satnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Te površinske molekule tipični su biljezi aktiviranja monocitnog THP-1 i mogu oponašati aktiviranje dendritičnih stanica, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji površinskih biljega mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica protutijelima označenima fluorokromom. Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije površinskih biljega pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se relativni intenzitet fluorescencije površinskih biljega u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 26.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 20. do 22.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

▼M8

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu h-CLAT DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 158 (18.), koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM. Preporučuje se primjena tog protokola pri provedbi i primjeni metode h-CLAT u laboratoriju. U nastavku su opisane glavne sastavnice i postupci za metodu h-CLAT, koja se sastoji od dva koraka: *testa za utvrđivanje doze* i *mjerenja ekspresije CD86/CD54*.

Priprema stanica

10. Za provođenje metode h-CLAT treba upotrebljavati THP-1, ljudsku staničnu liniju monocitne leukemije. Preporučuje se da se stanice (TIB-202™) nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.

11. Stanice THP-1 uzgajaju se na 37°C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanola, 100 jedinica/ml penicilina i 100 μg/ml streptomicina. Može se izbjeći upotreba penicilina i streptomicina u mediju za uzgoj kulture. Međutim, korisnici u tim slučajevima trebaju potvrditi da izostanak antibiotika u mediju za uzgoj kulture ne utječe na rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. U svakom slučaju, dobru praksu za održavanje staničnih kultura treba poštovati neovisno o prisustvu ili odsustvu antibiotika u mediju za uzgoj kultura kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Stanice THP-1 rutinski se nasađuju svaka 2–3 dana pri gustoći od 0,1 do 0,2 × 10^6 stanica/ml. Trebaju se održavati pri gustoći od 0,1 do 1,0 × 10^6 stanica/ml. Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Reaktivnost stanica treba provjeriti upotrebom pozitivnih kontrola, 2,4-dinitroklorbenzena (DNCB) (CAS br. 97-00-7, čistoće ≥ 99 %) i niklova sulfata ($NiSO_4$) (CAS br. 10101-97-0, čistoće ≥ 99 %) te negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), dva tjedna nakon odmrzavanja. I DNCB i $NiSO_4$ trebaju dati pozitivan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54, a LA treba dati negativan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54. Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu razmnožavati do dva mjeseca nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 30. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanima u stavcima od 20. do 24.

12. Za ispitivanje se stanice THP-1 nasađuju pri gustoći od 0,1 × 10^6 stanica/ml ili 0,2 × 10^6 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom 72 sata ili 48 sati. Važno je da gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon razdoblja pretkulture bude što dosljednija u svim pokusima (upotrebom jednog od dva prethodno opisana uvjeta za pretkulturu) jer bi gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon pretkulture mogla utjecati na ekspresiju CD86/CD54 koju induciraju alergeni (19.). Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 2 × 10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 24 jažice s ravnim dnom (500 μl, 1 × 10^6 stanica/jažici) ili ploču s 96 jažica s ravnim dnom (80 μl, 1,6 × 10^5 stanica/jažici).

Test za utvrđivanje doze

13. *Test za utvrđivanje doze* provodi se kako bi se utvrdio CV75, odnosno koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do vijabilnosti stanica od 75 % (CV) u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem. Vrijednost CV75 upotrebljava se za utvrđivanje koncentracije ispitivane kemikalije za mjerenje ekspresije *CD86/CD54* (vidjeti stavke od 20. do 24.).

▼M8

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za metodu h-CLAT ispitivane kemikalije otapaju se ili se stabilno dispergiraju (vidjeti i stavak 4.) u fiziološkoj otopini ili mediju kao prvoj opciji za otapalo/nosač ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva ili ne tvori stabilnu disperziju u prethodna dva otapala/nosača, tako da se dobije konačna koncentracija od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u). Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.

15. Počevši od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u) glavnih otopina ispitivanih kemikalija, treba provesti sljedeće korake razrjeđivanja:

— ako se kao otapalo/nosač upotrebljava fiziološka otopina ili medij: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Ako najveća konačna koncentracija na ploči od 1 000 μg/ml nije toksična, najveću koncentraciju treba ponovno utvrditi provođenjem novog ispitivanja citotoksičnosti. Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 μg/ml za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u fiziološkoj otopini ili mediju,

— ako se kao otapalo/nosač upotrebljava DMSO: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 250 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 1 000 μg/ml čak i ako ta koncentracija nije toksična.

Radne otopine naposljetku se koriste za izlaganje dodavanjem volumena radne otopine koji je jednak volumenu suspenzije stanica THP-1 na ploči (vidjeti i stavak 17.) kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (konačni raspon koncentracija na ploči obično iznosi 7,81–1 000 μg/ml).

16. Kao kontrola s otapalom/nosačem u metodi h-CLAT upotrebljava se medij za uzgoj kulture (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane (vidjeti stavak 4.) u mediju ili fiziološkoj otopini) ili DMSO (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u) ispitani pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči od 0,2 %. Kontrola se podvrgava istom razrjeđivanju kao što je ono opisano za radne otopine u stavku 15.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Medij za uzgoj kulture ili radne otopine opisane u stavcima 15. i 16. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 24 jažice ili s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju 24 ± 0,5 h na temperaturi od 37°C s 5 % CO_2. Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama (20.).

▼M8

Bojenje propidijevim jodidom (PI)

18. Nakon izlaganja od 24 ± 0,5 h stanice se prenose u epruvete za uzorke i prikupljaju centrifugiranjem. Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ponovno se suspendiraju s 200 µl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 µl (u slučaju upotrebe 24 jažice) fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina (pufer za bojenje). 200 µl suspenzije stanica prenosi se na ploču s 96 jažica s okruglim dnom (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili mikroepruvetu (u slučaju upotrebe 24 jažice) te se dvaput ispire s 200 µl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 µl (u slučaju upotrebe 24 jažice) pufera za bojenje. Stanice se naposljetku ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 µl) i dodaje se otopina propidijeva jodida (npr. 20 µl) (na primjer, konačna koncentracija propidijeva jodida iznosi 0,625 µg/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomicin D (7-AAD), tripansko modrilo ili drugi, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2.

Mjerenje citotoksičnosti protočnom citometrijom i procjena vrijednosti CV75

19. Apsorbancija propidijeva jodida analizira se upotrebom protočne citometrije s kanalom očitanja FL-3. Očitava se ukupno 10 000 živih stanica (negativnih na PI). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednadžba. Ako je vijabilnost stanica niska, treba se očitati do 30 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$vijabilnost\ stanica = \frac{broj\ živih\ stanica}{ukupan\ broj\ očitanih\ stanica} \times 100$$

Vrijednost CV75 (vidjeti stavak 13.), tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica THP-1 od 75 % (citotoksičnost od 25 %), računa se log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

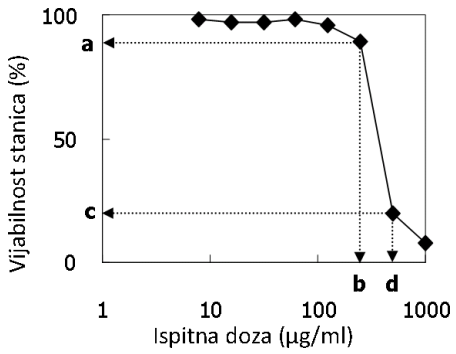
pri čemu je:

a najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 75 %;

c najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 75 %;

b i d su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica a odnosno c.

▼M8



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV75 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

Mjerenje ekspresije CD86/CD54

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

20. Za otapanje ili stabilno dispergiranje ispitivanih kemikalija upotrebljava se odgovarajuće otapalo/nosač (fiziološka otopina, medij ili DMSO; vidjeti stavak 14.). Ispitivane kemikalije prvo se razrjeđuju na koncentraciju koja odgovara vrijednosti koja je 100 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 500 puta (za DMSO) veća od 1,2 × CV75 utvrđenom u *testu za utvrđivanje doze* (vidjeti stavak 19.). Ako se CV75 ne može utvrditi (tj. u *testu za utvrđivanje doze* nije uočena dovoljna citotoksičnost), kao početnu koncentraciju treba upotrijebiti najvišu koncentraciju ispitivane kemikalije pripremljenu sa svakim otapalom/nosačem koja se može otopiti ili stabilno dispergirati. Napominje se da konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 μg/ml (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili 1 000 μg/ml (u slučaju DMSO-a). Zatim se prave serijska razrjeđivanja s faktorom razrjeđivanja od 1,2 upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača kako bi se dobile glavne otopine (osam koncentracija u rasponu od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (za fiziološku otopinu ili medij) ili od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (za DMSO)) koje se ispituju metodom h-CLAT (primjer plana doziranja vidjeti u protokolu DB-ALM br. 158). Glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 250 puta (za DMSO) u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Te radne otopine naposljetku se upotrebljavaju za izlaganje uz dodatni faktor dvostrukog konačnog razrjeđivanja na ploči. Ako rezultati ne ispunjavaju kriterije prihvatljivosti opisane u stavcima 29. i 30. u pogledu vijabilnosti stanica, *test za utvrđivanje doze* može se ponoviti kako bi se utvrdila preciznija vrijednost CV75. Napominje se da se za mjerenje ekspresije CD86/CD54 mogu upotrebljavati samo ploče s 24 jažice.

21. Kontrola s otapalom/nosačem priprema se kako je opisano u stavku 16. U metodi h-CLAT kao pozitivna kontrola upotrebljava se DNCB (vidjeti stavak 11.), za koji se glavne otopine pripremaju u DMSO-u i razrjeđuju kako je opisano za glavne otopine u stavku 20. DNCB treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (obično 4,0 μg/ml). Kako bi se na ploči dobila koncentracija DNCB-a od 4,0 μg/ml, priprema se glavna otopina DNCB-a u DMSO-u od 2 mg/ml, koja se dodatno razrjeđuje 250 puta medijem za uzgoj kulture kako bi se dobila radna otopina od 8 μg/ml. Umjesto toga,

▼M8

kao koncentracija pozitivne kontrole može se upotrebljavati i CV75 DNCB-a, koji se utvrđuje u svakoj ustanovi koja provodi ispitivanje. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kod pozitivnih kontrola jedna konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 μg/ml (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili 1 000 μg/ml (u slučaju DMSO-a). Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 29.), osim u slučaju posljednjeg kriterija prihvatljivosti jer se pozitivna kontrola ispituje u samo jednoj koncentraciji.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

22. Za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar potreban je jedan pokus kako bi se dobilo predviđanje. Svaki se pokus sastoji od najmanje dva neovisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* (vidjeti stavke od 26. do 28.). Svaki se neovisni ciklus provodi na različite dane ili na isti dan ako su za svaki ciklus ispunjeni sljedeći uvjeti: a) pripremljene su svježe glavne i radne otopine ispitivane kemikalije i otopine s protutijelima i b) upotrebljavaju se neovisno izdvojene stanice (tj. stanice su prikupljene iz različitih tikvica s kulturom); međutim, stanice mogu biti iz iste pasaže. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremljene kao radne otopine (500 μl) miješaju se s 500 μl suspendiranih stanica (1×10^6 stanica) u omjeru 1: 1 te se stanice inkubiraju 24 ± 0,5 h kako je opisano u stavcima 20. i 21. U svakom je ciklusu dovoljno jedno ponavljanje za svaku koncentraciju ispitivane kemikalije i kontrolne tvari jer se predviđanje izvodi na temelju najmanje dva neovisna ciklusa.

Bojenje i analiza stanica

23. Nakon 24 ± 0,5 h izlaganja stanice se prenose s ploče s 24 jažice u epruvete za uzorke, prikupljaju se centrifugiranjem i zatim dvaput ispiru s 1 ml pufera za bojenje (ako je potrebno, mogu se provesti dodatni koraci ispiranja). Nakon ispiranja stanice se blokiraju sa 600 μl otopine za blokiranje (pufer za bojenje koji sadržava 0,01 % (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ili ekvivalentno)) i inkubiraju 15 minuta na 4°C. Nakon blokiranja stanice se podijele u tri alikvota od 180 μl na ploču s 96 jažica s okruglim dnom ili u mikroepruvetu.

24. Nakon centrifugiranja stanice se boje s 50 μl protutijela anti-CD86, anti-CD54 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4°C u trajanju od 30 minuta. Trebaju se upotrebljavati protutijela opisana u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.) razrjeđivanjem u omjeru 3: 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ili 3: 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) puferom za bojenje. Subjekti koji su razvili ispitivanje utvrdili su da ti faktori razrjeđenja protutijela daju najbolji omjer signala i šuma. Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koje je koncentracije najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i druga protutijela anti-CD86 i/ili anti-CD54 označena fluorokromom ako se može pokazati da ona daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2. Treba napomenuti da promjena klona ili dobavljača protutijela, kako je opisano u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.), može utjecati na rezultate. Nakon ispiranja sa 150 μl pufera za bojenje dva ili više puta stanice se ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 μl) i dodaje se otopina propidijeva

▼M8

jodida (npr. 20 μl kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,625 μg/ml) ili otopina drugog biljega citotoksičnosti (vidjeti stavak 18.). Razine ekspresije CD86 i CD54 te vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

25. Ekspresija CD86 i CD54 analiza se protočnom citometrijom s kanalom očitanja FL-1. Na temelju geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) relativni intenzitet fluorescencije (RFI) za CD86 i CD54 za stanice pozitivne kontrole (ctrl) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:

$$RFI = \frac{\begin{array}{c}MFI\ stanica\ tretiranih\ kemikalijom - \\ MFI\ stanica\ kontrole\ izotipa\ tretiranih\ kemikalijom\end{array}}{\begin{array}{c}MFI\ stanica\ kontrole\ tretiranih\ otapalom/nosačem - \\ MFI\ stanica\ kontrole\ izotipa\ tretiranih\ otapalom/nosačem\end{array}} \times 100$$

Vijabilnost stanica iz stanica kontrole izotipa (ctrl) (koje se boje mišjim protutijelima IgG1 (izotip)) isto se računa prema jednadžbi opisanoj u stavku 19.

Model predviđanja

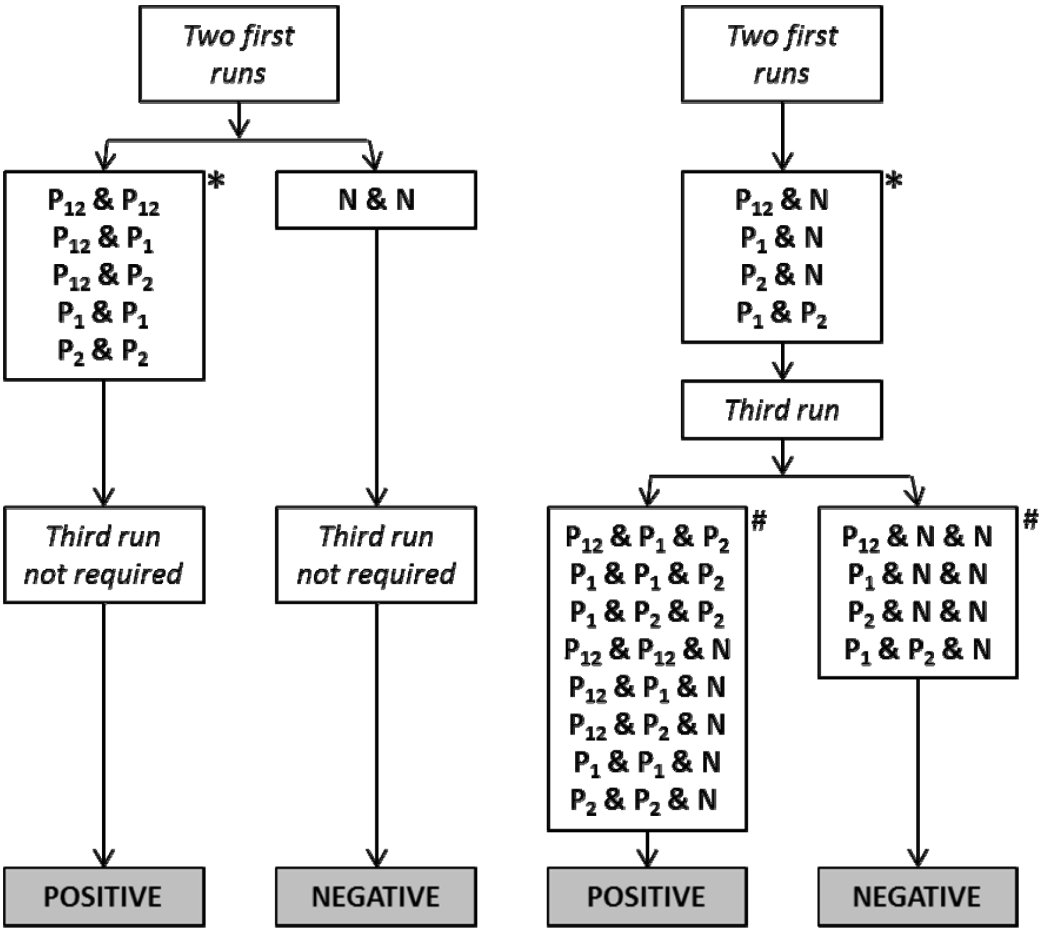
26. Kod mjerenja ekspresije *CD86/CD54* svaka ispitivana kemikalija ispituje se u najmanje dva neovisna ciklusa kako bi se izvelo jedno predviđanje (POZITIVNO ili NEGATIVNO). Predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM ako je ispunjen barem jedan od sljedećih uvjeta u dva od dva neovisna ciklusa ili u barem dva od tri neovisna ciklusa; u protivnom se predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra NEGATIVNIM (slika 1.):

— RFI za CD86 jednak je ili veći od 150 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %),

— RFI za CD54 jednak je ili veći od 200 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %).

27. Na temelju prethodno navedenoga, ako su prva dva ciklusa pozitivna za CD86 i/ili su oba pozitivna za CD54, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus. Slično tomu, ako su prva dva ciklusa negativna za oba biljega, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM (uzimajući u obzir odredbe stavka 30.) i nije potreban treći ciklus. Međutim, ako prva dva ciklusa nisu usklađena za barem jedan od biljega (CD54 ili CD86), potreban je treći ciklus i konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu triju neovisnih ciklusa (tj. na dva ciklusa od tri provedena). Kad je riječ o tome, treba napomenuti da je potreban treći ciklus ako se provode dva neovisna ciklusa i jedan je pozitivan samo za CD86 (dalje u tekstu „P_1”), a drugi je pozitivan samo za CD54 (dalje u tekstu „P_2”). Ako je treći ciklus negativan za oba biljega (dalje u tekstu „N”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM. S druge strane, ako je treći ciklus pozitivan za bilo koji biljeg (P_1 ili P_2) ili za oba biljega (dalje u tekstu „P_{12}”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM.

▼**M8**



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u metodi h-CLAT. Predviđanje na temelju testa h-CLAT trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”.

P_1: ciklus u kojem je samo CD86 pozitivan; P_2: ciklus u kojem je samo CD54 pozitivan; P_{12}: ciklus u kojem su i CD86 i CD54 pozitivni; N: ciklus u kojem ni CD86 ni CD54 nisu pozitivni.

* U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz prva dva ciklusa, neovisno o redoslijedu kojim se mogu dobiti.

U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru, ali ne odražavaju redoslijed kojim se mogu dobiti.

28. Za ispitivane kemikalije koje se testom h-CLAT predvide kao POZITIVNE mogu se utvrditi dvije vrijednosti učinkovite koncentracije (EC), EC150 za CD86 i EC200 za CD54, tj. koncentracije pri kojima su ispitivane kemikalije inducirale RFI od 150 ili 200. Te bi vrijednosti EC potencijalno mogle pridonijeti procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (9.) ako se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa kao što je IATA (4., 5., 6., 7. i 8.). Mogu se izračunati prema sljedećim jednadžbama:

▼M8

$$EC\ 150\ (za\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (za\ CD54) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

pri čemu je:

A_{conc} = najniža koncentracija u μg/ml kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{conc} = najviša koncentracija u μg/ml kod koje je RFI < 150 (CD86) ili 200 (CD54)

A_{RFI} = RFI pri najnižoj koncentraciji kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{RFI} = RFI pri najvišoj koncentraciji kod koje je RFI< 150 (CD86) ili 200 (CD54)

Radi preciznijeg izvođenja vrijednosti EC150 i EC200 možda će biti potrebna tri neovisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54*. Konačne vrijednosti EC150 i EC200 zatim se određuju kao srednja vrijednost EC-ova izračunanih iz tri neovisna ciklusa. Ako samo dva od tri neovisna ciklusa ispunjavaju kriterije za pozitivan rezultat (vidjeti stavke 26. i 27.), prihvaća se viša vrijednost od dviju izračunanih vrijednosti EC150 ili EC200.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje metoda h-CLAT (22. i 27.).

— Vijabilnost stanica u kontroli s medijem i kontrolama s otapalom/nosačem trebala bi biti veća od 90 %.

— Kod kontrole s otapalom/nosačem, vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 ne bi trebale biti veće od pozitivnog kriterija (RFI za CD86 ≥ 150 % i RFI za CD54 ≥ 200 %). Vrijednosti RFI kontrole s otapalom/nosačem računaju se upotrebom formula opisanih u stavku 25. („MFI kemikalije” treba zamijeniti „MFI-jem otapala/nosača”, a „MFI otapala/nosača” treba zamijeniti „MFI-jem kontrole (s medijem)”).

— I za kontrole s medijem i kontrole s otapalom/nosačem omjer MFI-ja i za CD86 i za CD54 u odnosu na kontrolu izotipa treba biti > 105 %.

— Kod pozitivne kontrole (DNCB), vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 trebaju ispuniti pozitivne kriterije (RFI za CD86 ≥ 150 i RFI za CD54 ≥ 200), a vijabilnost stanica treba biti veća od 50 %.

— Kod ispitivane kemikalije vijabilnost stanica treba biti veća od 50 % u najmanje četiri ispitane koncentracije u svakom ciklusu.

30. Negativni rezultati prihvatljivi su samo za ispitivane kemikalije koje pokazuju vijabilnost stanica manju od 90 % pri najvišoj ispitanoj koncentraciji (tj. 1,2 × CV75 u skladu s planom razrjeđivanja opisanim u stavku 20.). Ako vijabilnost stanica pri koncentraciji od 1,2 × CV75 iznosi 90 % ili više, negativan rezultat treba odbaciti. U tom se slučaju preporučuje da se pokuša preciznije odrediti odabir doze ponovnim utvrđivanjem vrijednosti CV75. Treba napomenuti da je negativan rezultat prihvatljiv čak i ako je vijabilnost stanica veća od 90 % ako se kao najveća ispitivana koncentracija ispitivane kemikalije upotrebljava 5 000 μg/ml u fiziološkoj otopini (ili mediju ili drugim otapalima/nosačima), 1 000 μg/ml u DMSO-u ili najviša topljiva koncentracija.

▼M8

Izvješće o ispitivanju

31. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, Log Kow, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

— opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, Log K_{ow}, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

▼**M8**

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljenog ispitivanja,

— upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),

— upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, globulin, protutijela i biljege citotoksičnosti,

— postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

— vijabilnost stanica, vrijednosti MFI i RFI dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,

— vijabilnost stanica i vrijednosti RFI dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,

— vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

▼**M8**

Ispitni postupak:

— broj upotrijebljenih ciklusa,

— koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka, uključujući CV75 (ako je primjenjivo), geometrijski MFI, RFI, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150/EC200 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,

— opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

— rasprava o rezultatima dobivenima metodom h-CLAT,

— rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

1. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767.–773.

2. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428.–437.

3. EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

4. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318.–1332.

5. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333.–1347.

6. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489.–504.

▼**M8**

7. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371.–379.

8. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337.–351.

9. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355.–2383.

10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150.–60.

12. EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing.

13. EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599.–609.

15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275.–284.

16. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin 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 (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81.–88.

18. DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupno na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

▼**M8**

19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70.–82.

20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89.–96.

21. OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz, Francuska, 2005., str. 96.

22. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Dostupno na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

23. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27.–35.

▼M8

Dodatak 1.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost" u smislu udjela točnih ishoda testa (21.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do štetnog ishoda *in vivo* (22.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV75: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 75 %.

EC150: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 150 u ekspresiji CD86.

EC200: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 200 u ekspresiji CD54.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

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

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

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

▼**M8**

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

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relativni intenzitet fluorescencije (RFI): relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi s MFI-jem stanica tretiranih otapalom/nosačem.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (21.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (21.).

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

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

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

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

▼M8

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (23.).

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

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (21.).

▼M8

Dodatak 1.2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa h-CLAT te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV75, EC150 i EC200 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su komercijalnu dostupnost tvari te dostupnost visokokvalitetnih *in vivo* referentnih podataka i visokokvalitetnih *in vitro* podataka dobivenih metodom h-CLAT. Isto tako, za metodu h-CLAT dostupni su objavljeni referentni podaci (3. i 14.).

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za provedbu metode h-CLAT

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje ***in vivo*** (1)	Referentni raspon za CV75 u µg/ml (2)	Rezultati testa h-CLAT za CD86 (referentni raspon za EC150 u µg/ml) (2)	Rezultati testa h-CLAT za CD54 (referentni raspon za EC200 u µg/ml) (2)
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	2–12	Pozitivno (0,5–10)	Pozitivno (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	5–95	Pozitivno (< 40)	Negativno (> 1,5) (3)
Niklov sulfat	10101-97-0	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–500	Pozitivno (< 100)	Pozitivno (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–400	Negativno (> 10) (3)	Pozitivno (10–140)
R (+)-limonen	5989-27-5	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	> 20	Negativno (> 5) (3)	Pozitivno (< 250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	25–100	Pozitivno (20–90)	Pozitivno (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	1500-5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
4-aminobenzojeva kiselina	150-13-0	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 1 000	Negativno (> 1 000)	Negativno (> 1 000)

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

(1) Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (3. i 14.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (24.).

(2) Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (13. i 25.).

(3) U prijašnjim je ispitivanjima za taj biljeg dobivena većina negativnih rezultata i stoga se uglavnom očekuje negativan rezultat. Navedeni raspon utvrđen je na temelju nekoliko uočenih prijašnjih pozitivnih rezultata. Ako se dobije pozitivan rezultat, vrijednost EC treba biti unutar navedenog referentnog raspona.

▼M8

Dodatak 2.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST AKTIVIRANJA STANIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Testom U-SENS™ kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86) kod ljudske stanične linije histiocitnog limfoma U937, nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 kod stanične linije U937 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

2. Test U-SENS™ ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) kojom je koordinirao L'Oreal te ga je kasnije neovisno stručno pregledao Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC) Referentnog laboratorija Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) (3.). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM je preporučio da se test U-SENS™ (4.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U smjernicama za izvješćivanje o strukturiranim pristupima integraciji podataka i pojedinačnim izvorima informacija koji se upotrebljavaju u okviru IATA-e za preosjetljivost kože OECD trenutačno raspravlja o nizu studija slučaja u kojima se opisuju različite strategije ispitivanja i modeli predviđanja. Jedan od različitih utvrđenih pristupa temelji se na testu U-SENS (5.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih testom U-SENS™ u kombinaciji s ostalim informacijama, uključujući prijašnje podatke i postojeće valjane podatke dobivene na ljudima (6.) navode se i u drugoj literaturi (4., 5. i 7.).

3. Pokazalo se da se test U-SENS™ može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija biti reda veličine 90 %, a između više laboratorija 84 % (8.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (8.) i drugim objavljenim studijama (1.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 86 % (N = 166), uz osjetljivost od 91 % (118/129) i specifičnost od 65 % (24/37). U usporedbi s podacima dobivenima na ljudima, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 77 % (N = 101) uz osjetljivost od 100 % (58/58) i specifičnost od 47 % (20/43). U usporedbi s analizom LLNA, veća je vjerojatnost da će se metodom U-SENS™ dobiti lažno negativna predviđanja kod kemikalija koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego kod kemikalija koje pokazuju veliki potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (1., 8. i 9.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost testa U-SENS™ kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode U-SENS™ kao samostalnog testa samo su okvirne jer je taj test potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod". Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

▼**M8**

4. Na temelju podataka koji su trenutačno dostupni pokazalo se da je test U-SENS™ primjenjiv na ispitivane kemikalije (uključujući kozmetičke sastojke, npr. konzervanse, površinski aktivne tvari, aktivne tvari, boje) koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijska svojstva, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena u istraživanjima *in vivo*) i spektar mehanizama reakcije za koje je poznato da su povezani s preosjetljivošću kože (tj. Michaelov akceptor, nastanak Schiffovih baza, agens za prijenos acila, bimolekulska nukleofilna supstitucija [SN2] ili nukleofilna aromatska supstitucija [SNAr]) (1., 8., 9. i 10.). Test U-SENS™ primjenjiv je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 13.). Za kemikalije u skupu podataka za koje je navedeno da su prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom) ili prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) testom U-SENS™ dobivena su točna predviđanja (1. i 10.). Tvari koje djeluju disruptivno na membranu mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata zbog nespecifičnog povećanja ekspresije CD86, s obzirom na to da su tri lažno pozitivna rezultata od njih sedam, u odnosu na referentno razvrstavanje *in vivo*, dale površinski aktivne tvari (1.). Stoga bi pozitivne rezultate dobivene s površinski aktivnim tvarima trebalo uzeti u obzir s oprezom, dok bi se negativni rezultati i dalje mogli upotrebljavati kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja ne izaziva preosjetljivost. Testom U-SENS™ mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (1.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om (potencijalni lažno negativni rezultati) ili propidijevim jodidom (ne može se izmjeriti vijabilnost). U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. S obzirom na navedeno, pozitivne rezultate s površinski aktivnim tvarima i negativne rezultate s jako fluorescentnim ispitivanim kemikalijama trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se test U-SENS™ ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

5. Kao što je opisano, test U-SENS™ pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogao bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti. Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni testom U-SENS™ mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad, koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.

6. Definicije su navedene u Dodatku 2.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Test U-SENS™ je analiza *in vitro* kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 na ljudskoj staničnoj liniji histiocitnog limfoma, stanicama U937, nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji 45 ± 3 h. Površinski biljeg CD86 jedan je tipični biljeg aktivacije stanica U937. Poznato je da je CD86 kostimulacijska molekula koja može oponašati aktiviranje monocita, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica, obično protutijelima označenima fluorescein izotiocijanatom (FITC). Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti (npr. upotrebom propidijeva jodida) kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se indeks stimulacije (S.I.)

▼M8

staničnih površinskih biljega CD86 u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 19.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 2.2. u skladu s dobrom praksom za metode *in vitro* (11.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke 15. i 16.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu U-SENS™ DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 183 (12.). Pri provedbi i primjeni testa U-SENS™ u laboratoriju treba primjenjivati standardne operativne postupke (SOP). Za provedbu testa U-SENS™ može se koristiti i automatizirani sustav ako se može pokazati da on daje slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. U nastavku su opisane glavne komponente i postupci za test U-SENS™.

Priprema stanica

10. Za provedbu testa U-SENS™ treba upotrebljavati U937, ljudsku staničnu liniju histiocitnog limfoma (13.). Stanice (klon CRL1593.2) treba nabaviti iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.

11. Stanice U937 uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (potpuni medij). Stanice U937 rutinski se pasažiraju svaka 2–3 dana pri gustoći od 1,5 ili 3×10^5 stanica/ml. Gustoća stanica ne bi trebala biti veća od 2×10^6 stanica/ml, a vijabilnost stanica izmjerena izbacivanjem tripanskog modrila treba biti ≥ 90 % (ne primjenjuje se kod prve pasaže nakon odmrzavanja). Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjava li svaka šarža stanica, FCS-a ili protutijela zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Provjeru reaktivnosti stanica treba provesti upotrebom pozitivne kontrole, 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) (CAS br. 2508-19-2, čistoće ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), barem jedan tjedan nakon odmrzavanja. U provjeri reaktivnosti treba ispitati šest konačnih koncentracija za svaku od dviju kontrola (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml te LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS otopljen u potpunom mediju treba dati pozitivan odgovor za CD86 koji je povezan s koncentracijom (npr. kada pozitivnu koncentraciju, indeks stimulacije za CD86 ≥ 150, prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86), a mliječna kiselina otopljena u potpunom mediju treba dati negativan odgovor za CD86 (vidjeti stavak 21.). Za test treba upotrebljavati samo šaržu stanica koja je dvaput prošla provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu razmnožavati do sedam tjedana nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 21. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanima u stavcima od 18. do 22.

▼M8

12. Za ispitivanje se stanice U937 nasađuju pri gustoći od 3×10^5 stanica/ml ili 6×10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom dva dana ili jedan dan. Mogu se upotrebljavati drugačiji uvjeti za prethodni uzgoj od prethodno opisanih ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje i ako se može pokazati da oni daju slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 5×10^5 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 96 jažica s ravnim dnom sa 100 µl (konačna gustoća stanica od $0{,}5 \times 10^5$ stanica/jažici).

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

13. Prije ispitivanja procjenjuje se topljivost. U tu se svrhu ispitivane kemikalije otapaju ili stabilno dispergiraju pri koncentraciji od 50 mg/ml u potpunom mediju kao prvoj opciji za otapalo ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva u potpunom mediju kao otapalu/nosaču. Za ispitivanje se ispitivana kemikalija otapa do konačne koncentracije od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ako je kemikalija topljiva u tom otapalu/nosaču. Ako je kemikalija topljiva samo u DMSO-u, kemikalija se otapa do koncentracije od 50 mg/ml. Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.

14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze, u prvom ciklusu treba ispitati šest konačnih koncentracija (1, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml) u odgovarajućem otapalu/nosaču, odnosno potpunom mediju ili 0,4-postotnom DMSO-u u mediju. U naknadnim se ciklusima pripremaju barem četiri radne otopine ispitivane kemikalije (tj. barem četiri koncentracije) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača, počevši od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ili 50 mg/ml u DMSO-u. Radne otopine naposljetku se koriste za tretiranje dodavanjem volumena suspenzije stanica U937 (vidjeti prethodni stavak 11.) koji je jednak volumenu radne otopine na ploči kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (12.). Koncentracije (najmanje četiri koncentracije) za daljnje cikluse odabiru se na temelju pojedinačnih rezultata svih prethodnih ciklusa (8.). Mogu se upotrebljavati konačne koncentracije od 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 i 200 µg/ml. Najveća konačna koncentracija iznosi 200 µg/ml. Ako se pri koncentraciji od 1 µg/ml uoči pozitivna vrijednost za CD86, ocjenjuje se 0,1 µg/ml kako bi se pronašla koncentracija ispitivane kemikalije koja ne inducira CD86 veći od pozitivnog praga. Za svaki se ciklus računa EC150 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne pozitivni prag za CD86 od 150 %, vidjeti stavak 19.) ako se uoči pozitivan odgovor na koncentraciju za CD86. Ako ispitivana kemikalija inducira pozitivan odgovor za CD86 koji nije povezan s koncentracijom, izračun vrijednosti EC150 možda neće biti relevantan, kako je opisano u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.). Za svaki se ciklus računa CV70 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne prag citotoksičnosti od 70 %, vidjeti stavak 19.) kad god je to moguće (12.). Kako bi se istražio učinak odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86, treba odabrati bilo koje koncentracije od upotrebljivih koncentracija koje su ravnomjerno raspoređene od EC150 (ili najveće koncentracije kod koje je CD86 negativan i koja nije citotoksična) do CV70 (ili najveće dopuštene koncentracije, tj. 200 µg/ml). Treba ispitati najmanje četiri koncentracije po ciklusu pri čemu barem dvije koncentracije trebaju biti iste kao i u prethodnom ciklusu radi usporedbe.

▼M8

15. Kao kontrola s otapalom/nosačem u testu U-SENS™ upotrebljava se potpuni medij (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u potpunom mediju) (vidjeti stavak 4.) ili 0,4-postotni DMSO u potpunom mediju (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u).

16. Kao pozitivna kontrola u testu U-SENS™ upotrebljava se TNBS (vidjeti stavak 11.) pripremljen u potpunom mediju. TNBS treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za mjerenje ekspresije CD86 pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (50 μg/ml) koja daje vijabilnost stanica > 70 %. Kako bi se na ploči dobila koncentracija TNBS-a od 50 μg/ml, priprema se glavna otopina TNBS-a od 1 M (tj. 293 mg/ml) u potpunom mediju, koja se dodatno razrjeđuje 2 930 puta potpunim medijem kako bi se dobila radna otopina od 100 μg/ml. Kao negativnu kontrolu treba upotrebljavati mliječnu kiselinu (LA, CAS 50-21-5) koncentracije 200 μg/ml, otopljenu u potpunom mediju (iz glavne otopine od 0,4 mg/ml). Na svakoj ploči svakog ciklusa pripremaju se tri ponavljanja netretirane kontrole s potpunim medijem, kontrole s otapalom/nosačem, negativne i pozitivne kontrole (12.). Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 12.).

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Kontrola s otapalom/nosačem ili radne otopine opisane u stavcima od 14. do 16. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju 45 ± 3 h na temperaturi od 37 °C s 5 % CO_2. Ploče se prije inkubacije zatvaraju polupropusnom membranom kako bi se spriječilo isparavanje hlapljivih ispitivanih kemikalija i unakrsna kontaminacija stanica tretiranih ispitivanim kemikalijama (12.).

Bojenje stanica

18. Nakon izlaganja od 45 ± 3 h stanice se prenose u mikrotitracijsku ploču u obliku slova „v” i prikupljaju centrifugiranjem. Interferencija s topljivošću definira se kao uočavanje kristala ili kapljica upotrebom mikroskopa 45 ± 3 h nakon tretiranja (prije bojenja stanica). Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ispiru se jednom sa 100 μl vrlo hladne fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma (pufer za bojenje). Nakon centrifugiranja stanice se ponovno suspendiraju sa 100 μl pufera za bojenje i boje s 5 μl (npr. 0,25 μg) protutijela anti-CD86 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4 °C u trajanju od 30 minuta, zaštićeno od svjetla. Treba upotrebljavati protutijela opisana u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.) (za CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, ili Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a za IgG1: BD-PharMingen #5557 48 ili Caltag/Invitrogen # GM4992). Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Za test se mogu upotrebljavati i drugi klonovi ili dobavljači protutijela koji su prošli provjeru reaktivnosti (vidjeti stavak 11.). Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koju je koncentraciju najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i drugi detekcijski sustavi, npr. protutijela anti-CD86 označena fluorokromom, ako se može pokazati da daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Nakon ispiranja sa 100 μl pufera za bojenje dva puta i jednom sa 100 μl vrlo hladnog PBS-a, stanice se ponovno suspendiraju u vrlo hladnom PBS-u (npr. 125 μl za uzorke koji se analiziraju ručno u pojedinačnim epruvetama ili 50 μl ako se upotrebljava ploča za automatsko uzorkovanje) i dodaje se otopina propidijeva jodida (konačna koncentracija

▼M8

od 3 μg/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) ili tripansko modrilo, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza protočnom citometrijom

19. Razina ekspresije CD86 i vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije. Stanice se prikazuju u točkastom dijagramu s veličinom (FSC) i granularnošću (SSC) na logaritamskoj skali kako bi se jasno identificirala populacija u prvim vratima R1 i uklonili ostaci. Za svaku se jažicu nastoji očitati ukupno 10 000 stanica u vratima R1. Stanice iz istih vrata R1 prikazuju se u FL3 ili FL4/SSC točkastom dijagramu. Žive stanice ograničavaju se postavljanjem drugih vrata R2 kojima se odabire populacija stanica negativnih na propidijev jodid (kanal FL3 ili FL4). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednadžba. Ako je vijabilnost stanica niska, može se očitati do 20 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$vijabilnost\ stanica = \frac{broj\ živih\ stanica}{ukupan\ broj\ očitanih\ stanica} \times 100$$

Zatim se među tim živim stanicama ograničenima na vratima R2 (unutar R1) mjeri postotak pozitivnih stanica u kanalu FL1. Stanična površinska ekspresija za CD86 analizira se u FL1/SSC točkastom dijagramu ograničenom na žive stanice (R2).

Za jažice koje sadržavaju potpuni medij/IgG1 marker za analizu postavlja se blizu glavne populacije tako da je IgG1 kontrola s potpunim medijem unutar ciljanog područja od 0,6 do 0,9 %.

Interferencija s bojom definira se kao pomak u točkastom dijagramu za IgG1 označen FITC-om (IgG1 FL1 Geo srednja vrijednost S.I. ≥ 150 %).

Indeks stimulacije (S.I.) za CD86 za kontrolne stanice (netretirane ili u 0,4-postotnom DMSO-u) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:.

$$S.I. = \frac{\%\ CD86^{+}tretiranih\ stanica - \%\ IgG1^{+}tretiranih\ stanica}{\%\ CD86^{+}kontrolnih\ stanica - \%\ IgG1^{+}kontrolnih\ stanica} \times 100$$

% $IgG1^{+}$ netretiranih kontrolnih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1 u kanalu FL1 koje se definiraju markerom za analizu (prihvaćeni raspon od ≥ 0,6 % do < 1,5 %, vidjeti stavak 22.) među živim netretiranim stanicama.

% $IgG1^{+}/CD86^{+}$ kontrolnih/tretiranih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1/CD86 u kanalu FL1 koji se mjeri bez pomicanja markera za analizu među živim kontrolnim/tretiranim stanicama.

▼**M8**

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

20. U testu U-SENS™ računaju se sljedeći parametri: vrijednost CV70, tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica U937 od 70 % (citotoksičnost od 30 %), i vrijednost EC150, tj. koncentracija pri kojoj su ispitivane kemikalije inducirale indeks stimulacije (S.I.) za CD86 od 150 %.

CV70 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

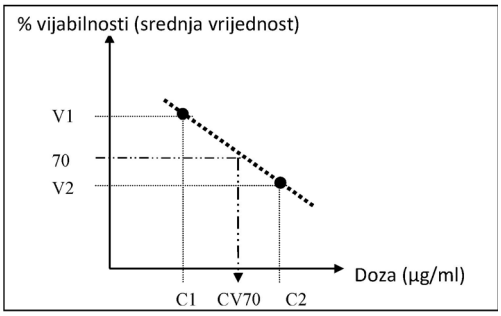
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemu je:

V1 najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 70 %;

V2 najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 70 %;

C1 i C2 su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica V1 odnosno V2.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV70 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

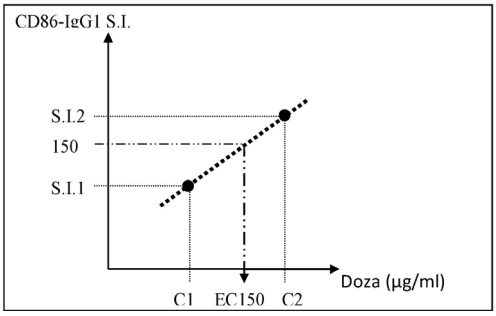
EC150 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

pri čemu je:

C1 = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



▼M8

Vrijednosti EC150 i CV70 računaju se:

— za svaki ciklus: pojedinačne vrijednosti EC150 i CV70 upotrebljavaju se kao alati za ispitivanje učinka odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86 (vidjeti stavak 14.),

— na temelju prosječnih vijabilnosti utvrđuje se ukupni CV70 (12.),

— na temelju prosječnog indeksa stimulacije vrijednosti CD86 utvrđuje se ukupni EC150 za ispitivanu kemikaliju za koju se testom U-SENS™ predvidi da je POZITIVNA (vidjeti stavak 21.) (12.).

Model predviđanja

21. Kod mjerenja ekspresije CD86 svaka ispitivana kemikalija ispituje se primjenom najmanje četiri koncentracije i u najmanje dva neovisna ciklusa (koji se provode na različite dane) kako bi se izvelo jedno predviđanje (NEGATIVNO ili POZITIVNO).

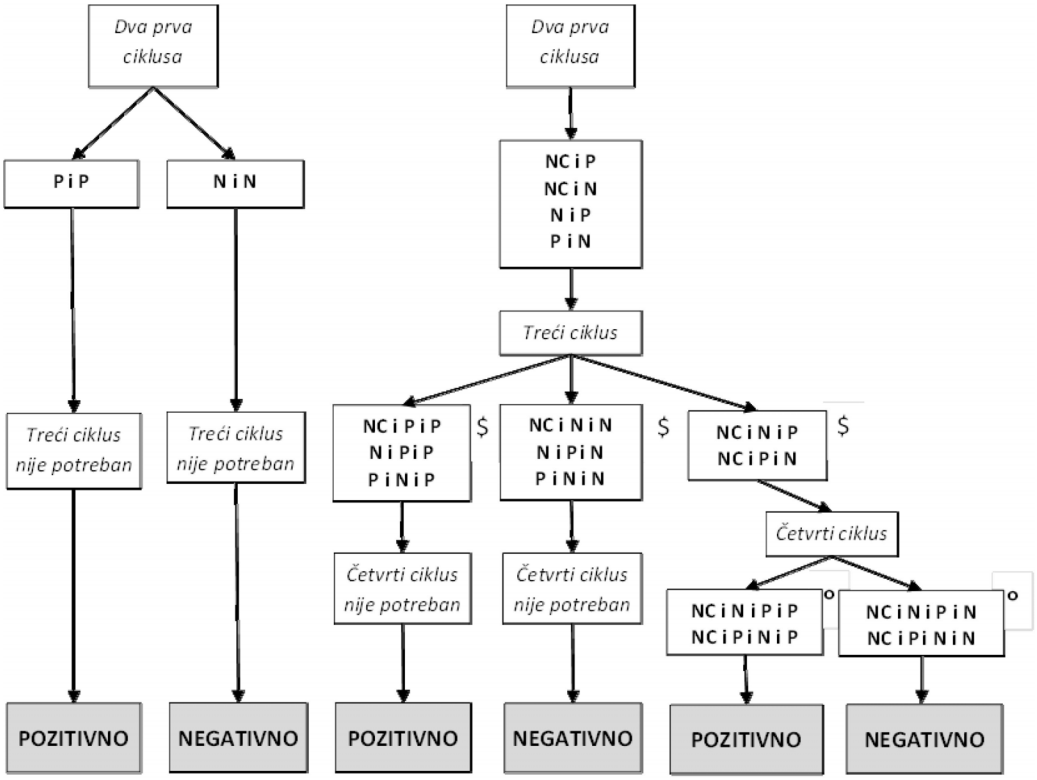
— Pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se negativnim (dalje u tekstu „N”) ako je indeks stimulacije za CD86 manji od 150 % pri svim koncentracijama koje nisu citotoksične (vijabilnost stanica $\geq$ 70 %) i ako se ne uoči nikakva interferencija (citotoksičnost, topljivost: vidjeti stavak 18. ili boja: vidjeti stavak 19., neovisno o necitotoksičnim koncentracijama pri kojima se opazi interferencija). U svim ostalim slučajevima: pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se pozitivnim (dalje u tekstu „P”) ako je indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % i/ili ako se uoče interferencije.

— Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM ako su negativna (N) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa negativna (N), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.

— Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM ako su pozitivna (P) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa pozitivna (P), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.

— Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze primjenjuje se iznimka ako je u prvom ciklusu indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % samo pri najvišoj necitotoksičnoj koncentraciji. Smatra se da ciklus tada NIJE JEDNOZNAČAN (NC) i u dodatnim ciklusima treba ispitati dodatne koncentracije (između najviše koncentracije koja ne uzrokuje citotoksičnost i najniže koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost – vidjeti stavak 20.). Ako se ciklus identificira kao NC, treba provesti barem dva dodatna ciklusa, a i četvrti ciklus ako drugi i treći nisu usklađeni (neovisno N i/ili P) (slika 1.). Naknadni ciklusi smatrat će se pozitivnima čak i ako samo jedna necitotoksična koncentracija pokaže CD86 jednak ili veći od 150 % jer je postavka koncentracije prilagođena za specifičnu ispitivanu kemikaliju. Konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu iz tri ili četiri pojedinačna ciklusa (tj. dva od tri ili dva od četiri) (slika 1.).

▼**M8**



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u testu U-SENS™. Predviđanje na temelju testa U-SENS™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e i u skladu s odredbama stavka 4. te stavaka 7., 8. i 9. iz odjeljka „Opći uvod”.

N: ciklus u kojem nije uočen pozitivan CD86 ili interferencija.

P: ciklus u kojem je uočen pozitivan CD86 i/ili interferencija.

NC: nije jednoznačno. Nije jednoznačno u prvom ciklusu ako je CD86 pozitivan samo pri najvišoj koncentraciji koja nije citotoksična.

#: pojedinačni zaključak koji nije jednoznačan (NC) koji se pripiše samo prvom ciklusu automatski podrazumijeva da je potreban treći ciklus kako bi se dobio većinski pozitivan (P) ili negativan (N) zaključak u barem dva od tri neovisna ciklusa.

$: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

°: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz četiri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva tri ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

Kriteriji prihvatljivosti

22. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test U-SENS™ (12.).

— Na kraju razdoblja izlaganja od 45 ± 3 h srednja vijabilnost kod tri ponavljanja netretiranih stanica U937 morala je biti > 90 % i bez uočenog pomaka u ekspresiji CD86. Bazalna ekspresija CD86 kod netretiranih stanica U937 morala je biti u rasponu od ≥ 2 % do ≤ 25 %.

▼M8

— Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, valjanost kontrole s nosačem DMSO procjenjuje se računanjem indeksa stimulacije za DMSO u usporedbi s netretiranim stanicama i srednja vijabilnost u tri ponavljanja stanica morala je biti > 90 %. Kontrola s nosačem DMSO valjana je ako je srednja vrijednost S.I. za CD86 u tri ponavljanja bila manja od 250 % srednje vrijednosti S.I. u tri ponavljanja za CD86 netretiranih stanica U937.

— Ciklusi se smatraju valjanima ako su barem dvije od tri vrijednosti IgG1 netretiranih stanica U937 bile u rasponu od ≥ 0,6 % do< 1,5 %.

— Istodobno ispitana negativna kontrola (mliječna kiselina) smatra se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila negativna (S.I. za CD86 < 150 %) i necitotoksična (vijabilnost stanica ≥ 70 %).

— Pozitivna kontrola (TNBS) smatrala se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila pozitivna (S.I. za CD86 ≥ 150 %) i necitotoksična (vijabilnost stanica ≥ 70 %).

Izvješće o ispitivanju

23. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

— opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

▼**M8**

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljenog ispitivanja,

— upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),

— upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, protutijela i biljege citotoksičnosti,

— postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

— vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije za CD86 dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,

▼M8

— vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,

— vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

Ispitni postupak:

— broj upotrijebljenih ciklusa,

— koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

— trajanje izlaganja,

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka, uključujući CV70 (ako je primjenjivo), indeks stimulacije, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,

— opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

— rasprava o rezultatima dobivenima testom U-SENS™,

— rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901.–916.

2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupno na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.

3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Dostupno na: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Dostupno na: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

6. OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337.–351.

8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373.–382.

9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, 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 metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683.–1696.

11. OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

12. DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostupno na: [http://ecvam-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 gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

15. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

16. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

17. ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelles. Dostupno na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Dodatak 2.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost" u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (14.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (15.).

Odgovor na koncentraciju CD86: ovisnost o koncentraciji (ili odgovor na koncentraciju) postoji ako pozitivnu koncentraciju (S.I. za CD86 $\geq$ 150) prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV70: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 70 %.

Pomak: pomak se definira na sljedeći način i. ispravljena vrijednost % $CD86^+$ netretiranog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % $CD86^+$ netretiranih kontrolnih ponavljanja 1 i 2 i ii. ispravljena vrijednost % $CD86^+$ negativnog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % $CD86^+$ negativnih kontrolnih ponavljanja 1 i 2.

EC150: procijenjene koncentracije koje pokazuju 150 % indeksa stimulacije ekspresije CD86.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

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

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

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

▼M8

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

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost, npr. oksidacijom.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (14.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (14.).

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

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

S.I.: indeks stimulacije. Relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi sa stanicama tretiranima otapalom.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma.

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

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovim ispitivanjem.

▼M8

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (16.).

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

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (14.).

▼M8

Dodatak 2.2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa U-SENS™ te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV70 i EC150 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom U-SENS™. Isto tako, za test U-SENS™ dostupni su objavljeni referentni podaci (1. i 8.).

Tablica 1. 1

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa U-SENS™

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje *in vivo* (1)	U-SENS Otapalo/nosač	U-SENS Referentni raspon za CV70 u µg/ml (2)	U-SENS Referentni raspon za EC150 u µg/ml (2)
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij (3)	< 30	Pozitivno (≤ 10)
2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina	2508-19-2	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij	> 50	Pozitivno (≤ 50)
Dietil-maleat	141-05-9	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	DMSO	10–100	Pozitivno (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Potpuni medij	> 100	Pozitivno (≤ 50)
Cinaminski alkohol	104-54-1	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (10–100)
4-alilanisol	140-67-0	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (< 200)
Saharin	81-07-2	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Salicilna kiselina	69-72-7	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

(1) Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (1. i 8.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (17.).

(2) Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 8.).

(3) Potpuni medij: medij RPMI-1640 obogaćen s 10 % fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (8.).

▼**M8**

Dodatak 3.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST IL-8 LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Za razliku od testova u kojima se analizira ekspresija staničnih površinskih biljega, testom IL8-Luc kvantificiraju se promjene u ekspresiji IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica (DC). Kod IL-8 reporterske stanične linije dobivene iz THP-1 (THP-G8, dobivena iz ljudske stanične linije akutne monocitne leukemije THP-1) ekspresija IL-8 mjeri se nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Ekspresija luciferaze zatim se upotrebljava kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

2. Test IL-8 Luc ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) koju su proveli JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda), METI (**Ministarstvo gospodarstva, trgovine i industrije**) i **JSAAE (Japansko društvo za alternative pokusima na životinjama**) te je kasnije podvrgnut neovisnom stručnom pregledu (3.) pod pokroviteljstvom JaCVAM-a i Ministarstva zdravlja, rada i dobrobiti, uz potporu **Međunarodne suradnje u području alternativnih metoda ispitivanja** (ICATM). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, test IL-8 Luc smatra se korisnim kao dio IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom IL-8 Luc u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5. i 6.).

3. Pokazalo se da se test IL-8 Luc može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva sa staničnim kulturama i mjerenjem luciferaze. Obnovljivost unutar jednog laboratorija iznosila je 87,7 %, a između laboratorija 87,5 % (2.). Podaci dobiveni u validacijskoj studiji (2.) i drugim objavljenim radovima (1. i 6.) pokazuju da je testom IL-8 Luc, u usporedbi s analizom LLNA, 118 kemikalija od njih 143 procijenjeno kao pozitivno ili negativno, a 25 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost (bez kategorije prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) iznosi 86 % (101/118), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 41 % (9/22). Isključujući tvari izvan područja primjene opisane u nastavku (stavak 5.), testom IL-8 Luc 113 kemikalija od njih 136 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 23 kemikalije kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc iznosi 89 % (101/113), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 53 % (9/17). Upotrebom podataka dobivenih na ljudima koji su navedeni u Urbisch i dr. (7.), testom IL-8 Luc 76 kemikalija od njih 90 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 14 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 80 % (61/76), osjetljivost 93 % (54/58), a specifičnost 39 % (7/18). Isključujući tvari izvan područja primjene, testom IL-8 Luc 71 kemikalija od njih 84 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 13 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 86 % (61/71), uz osjetljivost od 93 % (54/58) i specifičnost od 54 % (7/13). Veća je vjerojatnost da će se testom IL-8 Luc dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku/umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost (potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (6.). Navedene informacije idu u prilog upotrebi testa IL-8 Luc kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Točnost navedena za test IL-8 Luc kao samostalno ispitivanje služi samo

▼**M8**

kao smjernica jer je ispitivanje potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju ispitivanja izazivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da analiza LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se test IL-8 Luc može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (2. i 6.).

5. Iako se u testu IL-8 Luc kao otapalo upotrebljava X-VIVO™ 15, njime su točno ocijenjene kemikalije čija je vrijednost Log K_{ow} > 3,5 i čija je topljivost u vodi približno 100 μg/ ml, kako je izračunano programom EPI Suite™, te je njegova uspješnost u otkrivanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože i koje su slabo topljive u vodi bolja nego kod testa IL-8 Luc u kojem se kao otapalo upotrebljava dimetil sulfoksid (DMSO) (2.). Međutim, negativni rezultati za ispitivane kemikalije koje se ne otapaju pri koncentraciji od 20 mg/ml mogu dati lažno negativne rezultate jer se one ne mogu otopiti u otapalu X-VIVO™ 15. Stoga negativne rezultate za te ispitivane kemikalije ne treba razmatrati. U validacijskoj studiji uočen je visok udio lažno negativnih rezultata za anhidride. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti stanične linije (8.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju zračnom oksidacijom) mogu dati negativne rezultate u testu. Međutim, iako negativne rezultate za tvari za koje se sumnja da su prehapteni ili prohapteni treba tumačiti s oprezom, testom IL-8 Luc točno je procijenjeno 11 prehaptena od njih 11, šest od šest prohaptena te šest od osam prehaptena i prohaptena u podatkovnom skupu testa IL-8 Luc (2.). Na temelju nedavnog sveobuhvatnog pregleda triju ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) za otkrivanje prehaptena i prohaptena (9.) te na temelju činjenice da su stanice THP-G8 koje se upotrebljavaju u testu IL-8 Luc stanična linija izvedena iz stanične linije THP-1 koja se upotrebljava u testu h-CLAT, test IL-8 Luc može pridonijeti i povećanju osjetljivosti ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama za otkrivanje prehaptena i prohaptena u kombinaciji s drugim ispitivanjima. Površinski aktivne tvari koje su dosad ispitane dale su (lažno) pozitivne rezultate neovisno o njihovoj vrsti (npr. kationske, anionske ili neionske). Naposljetku, kemikalije koje ometaju luciferazu mogu poremetiti njezinu aktivnost/ mjerenje tako da uzrokuju prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju (10.). Na primjer, postoje izvješća o tome da su koncentracije fitoestrogena veće od 1 μM u drugim luciferaznim testovima ometale signale luminiscencije zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu. Stoga je potrebno pažljivo ispitati ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili spojeva za koje se pretpostavlja da dovode do aktivacije reporterskog gena za luciferazu slične aktivaciji fitoestrogenom (11.). Na temelju prethodno navedenog, površinski aktivne tvari, anhidridi i kemikalije koje ometaju luciferazu izvan su područja primjene ovog testa. U slučajevima u kojima se može dokazati da se test IL-8 Luc ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

6. Kao što je opisano, test IL-8 Luc pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Potreban je dodatan rad, po mogućnosti na temelju podataka dobivenih na ljudima, da bi se moglo utvrditi mogu li rezultati dobiveni testom IL-8 Luc pridonijeti procjeni jakosti ako se kombiniraju s drugim izvorima informacija.

▼M8

7. Definicije su navedene u Dodatku 3.1.

NAČELO ISPITIVANJA

8. U testu IL-8 Luc upotrebljava se ljudska stanična linija monocitne leukemije THP-1, koja se nabavlja iz banke stanica American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD). Upotrebom te stanične linije na Odjelu za dermatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Tohokuu (*Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine*) stvorena je stanična linija THP-G8, IL-8 reporterska stanična linija izvedena iz THP-1, koja nosi gene za stabilnu narančastu luciferazu (*Stable Luciferase Orange*; SLO) i stabilnu crvenu luciferazu (*Stable Luciferase Red*; SLR) koji su pod kontrolom promotora gena za IL-8 odnosno za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH) (1.). To omogućuje kvantitativno mjerenje indukcije gena za luciferazu određivanjem luminiscencije iz supstrata luciferaze za koje je poznato da stvaraju svjetlost, kao pokazatelja aktivnosti IL-8 i GAPDH-a u stanicama nakon izlaganja kemikalijama koje izazivaju preosjetljivost.

9. Ispitni sustav s dvije boje sastoji se od luciferaze koja emitira narančastu boju (SLO; λmax = 580 nm) (12.) za gensku ekspresiju s promotora gena za IL-8 te luciferaze koja emitira crvenu boju (SLR; λmax = 630 nm) (13.) za gensku ekspresiju s promotora gena za GAPDH kao interne kontrole. Dvije luciferaze emitiraju različite boje nakon reakcije s d-luciferinom krijesnice i njihova se luminiscencija mjeri istovremeno u reakciji u jednom koraku tako da se emisija iz smjese za testiranje podijeli upotrebom optičkog filtra (14.) (Dodatak 3.2.).

10. Stanice THP-G8 tretiraju se ispitivanom kemikalijom 16 sati, nakon čega se mjeri aktivnost SLO luciferaze (SLO-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8, te aktivnost SLR luciferaze (SLR-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH. Kako bi se kratice lakše razumjele, SLO-LA i SLR-LA određuju se kao IL8LA odnosno GAPLA. U tablici 1. naveden je opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc. Izmjerene vrijednosti upotrebljavaju se za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), odnosno omjera IL8LA i GAPLA, indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti nIL8LA netretiranih stanica THP-G8, te inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti GAPLA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti GAPLA netretiranih stanica THP-G8 te se upotrebljavaju kao pokazatelj citotoksičnosti.

Tablica 1.

Opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc

Kratice	Definicija
GAPLA	aktivnost SLR luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH
IL8LA	aktivnost SLO luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / nIL8LA netretiranih stanica

▼**M8**

Kratice	Definicija
Inh-GAPLA	GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / GAPLA netretiranih stanica
CV05	najniža koncentracija kemikalije pri kojoj Inh-GAPLA postaje < 0,05

11. Dostupni su zahtjevi izvedbe (15.) radi olakšavanja validacije izmijenjenih *in vitro* testova IL-8 s luciferazom sličnih testu IL-8 Luc te omogućivanja pravovremene izmjene Smjernice OECD-a za ispitivanje 442E radi njihova uključivanja. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamči se samo za ispitivanja koja su validirana u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao ta ispitivanja i uključio ih u Smjernicu OECD-a za ispitivanje 442E (16.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 3.3. u skladu s dobrom praksom za *in vitro* metode (17.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 15.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 21. do 24.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

13. Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za test IL-8 Luc te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi ispitivanja (18.). Laboratoriji koji su spremni provoditi ispitivanje mogu nabaviti rekombinantnu staničnu liniju THP-G8 od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nakon što potpišu sporazum o prijenosu materijala (MTA) u skladu s uvjetima iz OECD-ova predloška. U sljedećim stavcima opisuju se glavne sastavnice i postupci testa.

Priprema stanica

14. Za provedbu testa IL-8 Luc treba upotrebljavati staničnu liniju THP-G8 iz laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan (vidjeti stavke 8. i 13.). Nakon primitka stanice se razmnožavaju (od dvije do četiri pasaže) te čuvaju zamrznute kao homogena zaliha. Stanice iz te zalihe mogu se razmnožavati do najviše 12 pasaža ili najdulje šest tjedana. Za razmnožavanje se kao medij upotrebljava RPMI-1640, medij za uzgoj kulture koji sadržava 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), otopinu antibiotika/antimikotika (100 jedinica/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina i 0,25 µg/ml amfotericina B u 0,85-postotnoj fiziološkoj otopini) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS: 58-58-2) i 300 µg/ml G418 (npr. CAS: 108321-42-2).

15. Prije upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Tu provjeru treba provesti od jedan do dva tjedna ili od dvije do četiri pasaže nakon odmrzavanja, upotrebom pozitivne kontrole, 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistoća ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS: 50-21-5, čistoća ≥ 85 %). 4-NBB trebao bi dati pozitivan odgovor na Ind-IL8LA (≥ 1,4), dok bi LA trebao dati negativan odgovor na Ind-IL8LA (< 1,4). Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Provjeru treba provesti u skladu s postupcima opisanima u stavcima od 22. do 24.

▼M8

16. Za ispitivanje se stanice THP-G8 nasađuju pri gustoći od 2 do 5 × 10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom od 48 do 96 sati. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ispiru se medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika, a zatim se ponovno suspendiraju medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika pri gustoći od 1 × 10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na crnu ploču s 96 jažica s ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) s 50 µl (5 × 10^4 stanica/jažici).

Priprema ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

17. Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za test IL-8 Luc ispitivane kemikalije otapaju se u mediju X-VIVO™ 15, komercijalno dostupnom mediju bez seruma (Lonza, 04-418Q), tako da se dobije konačna koncentracija od 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 dodaje se u 20 mg ispitivane kemikalije (neovisno o topljivosti kemikalije) u epruvetu za mikrocentrifugu i dovodi do volumena od 1 ml, a zatim se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min 30 minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Nadalje, ako su kemikalije u krutom stanju i dalje netopljive, epruveta se ultrazvučno obrađuje dok se kemikalija potpuno ne otopi ili stabilno dispergira. Ako su ispitivane kemikalije topljive u mediju X-VIVO™ 15, otopina se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora razrjeđivanja od pet te se upotrebljava kao glavna otopina X-VIVO™ 15 ispitivane kemikalije (4 mg/ml). Ako ispitivana kemikalija nije topljiva u mediju X-VIVO™ 15, smjesa se ponovno protresa najmanje 30 minuta, a zatim se centrifugira pri 15000 o/min (≈ 20 000*g*) u trajanju od pet minuta; supernatant koji nastane upotrebljava se kao glavna otopina X-VIVO™ 15 ispitivane kemikalije. Upotrebu drugih otapala, kao što su DMSO, voda ili medij za uzgoj kulture, treba znanstveno obrazložiti. Podroban postupak za otapanje kemikalija prikazan je u Dodatku 3.5. Otopine medija X-VIVO™ 15 opisane u stavcima od 18. do 23. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 16.).

18. Prvi ciklus ispitivanja usmjeren je na utvrđivanje citotoksične koncentracije i ispitivanje potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Upotrebom medija X-VIVO™ 15, serijska razrjeđivanja glavne otopine X-VIVO™ 15 ispitivanih kemikalija prave se s faktorom razrjeđivanja od dva (vidjeti Dodatak 3.5.) upotrebom ploče za test s 96 jažica (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Zatim se 50 µl/jažici razrijeđene otopine dodaje u 50 µl suspenzije stanica na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom. Stoga su konačne koncentracije ispitivanih kemikalija koje su topljive u mediju X-VIVO ™ 15 u rasponu od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatak 3.5.). U slučaju ispitivanih kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO ™ 15 pri 20 mg/ml utvrđuju se samo faktori razrjeđivanja u rasponu od 2 do 2^{10}, iako stvarne konačne koncentracije ispitivanih kemikalija ostaju nesigurne i ovise o zasićenoj koncentraciji ispitivane kemikalije u glavnoj otopini medija X-VIVO ™ 15.

19. U kasnijim ciklusima ispitivanja (tj. drugom, trećem i četvrtom ponavljanju), glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se pri koncentraciji koja je četiri puta viša od koncentracije vijabilnosti stanica 05 (CV05; najniža koncentracija pri kojoj Inh-GAPLA postaje < 0,05) u prvom pokusu. Ako Inh-GAPLA ne postane manji od 0,05 pri najvišoj koncentraciji u prvom ciklusu, glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se upotrebom najviše koncentracije prvog ciklusa. Koncentracija CV05 računa se tako da se koncentracija glavne otopine u prvom ciklusu podijeli faktorom razrjeđivanja za CV05 (X) (faktor razrjeđivanja CV05 (X); faktor razrjeđivanja potreban za razrjeđivanje glavne otopine na CV05) (vidjeti Dodatak 3.5.). Za ispitivane tvari koje nisu topljive u mediju X-VIVO pri 20 mg/ml, CV05 se utvrđuje koncentracijom glavne otopine × 1/X. Za cikluse od drugog do četvrtog priprema se druga glavna otopina kao 4 × CV05 (Dodatak 3.5.).

▼M8

20. Serijska razrjeđivanja drugih glavnih otopina X-VIVO™ 15 prave se upotrebom faktora razrjeđivanja od 1,5 upotrebom ploče za test s 96 jažica. Zatim se 50 µl/jažici razrijeđene otopine dodaje u 50 µl suspenzije stanica u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaku koncentraciju svake ispitivane kemikalije treba ispitati u četiri jažice. Uzorci se zatim miješaju u jedinici za miješanje za ploče i inkubiraju 16 sati na 37 °C i s 5 % CO_2, nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u nastavku.

21. Kontrolu s otapalom čini smjesa 50 µl/jažici medija X-VIVO™ 15 i 50 µl/jažici suspenzije stanica u mediju RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a.

22. Kao pozitivna kontrola preporučuje se 4-NBB. Priprema se 20 mg 4-NBB-a u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml. Epruveta se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min najmanje 30 minuta. Nakon centrifugiranja pri 20 000 g tijekom pet minuta supernatant se razrjeđuje faktorom od 4 medijem X-VIVO™ 15 i 500 µl razrijeđenog supernatanta prenosi se u jažicu na ploči za test s 96 jažica. Razrijeđeni supernatant dodatno se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 s faktorima razrjeđivanja od 2 i 4 te se 50 µl otopine dodaje u 50 µl suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom (Dodatak 3.6.). Svaku koncentraciju pozitivne kontrole treba ispitati u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru CO_2 (37 °C, 5 % CO_2), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.

23. Kao negativna kontrola preporučuje se mliječna kiselina. Priprema se 20 mg mliječne kiseline u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml (20 mg/ml). Dvadeset mg/ml otopine mliječne kiseline razrjeđuje se medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 5 (4 mg/ml); 500 µl od tih 4 mg/ml otopine mliječne kiseline prenosi se u jažicu ploče za test s 96 jažica. Ta se otopina razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 2 te se ponovno razrjeđuje primjenom faktora od 2 kako bi se dobile otopine od 2 mg/ml i 1 mg/ml. 50 µl tih triju otopina i kontrole s nosačem (X-VIVO™ 15) dodaje se u 50 µl suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaka koncentracija negativne kontrole ispituje se u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru s CO_2 (37 °C, 5 % CO_2), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.

24. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne ili negativne kontrole pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa.

25. Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama.

26. Za ispitivane kemikalije i kontrolu s otapalom potrebna su od dva do četiri ciklusa kako bi se došlo do pozitivnog ili negativnog predviđanja (vidjeti tablicu 2.). Svaki ciklus provodi se na različite dane sa svježom glavnom otopinom medija X-VIVO™ 15 ispitivanih kemikalija i neovisno izdvojenim stanicama. Stanice mogu biti iz iste pasaže.

▼M8

Mjerenja aktivnosti luciferaze

27. Luminiscencija se mjeri luminometrom za mikrotitracijsku ploču s 96 jažica s optičkim filtrima, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Njemačka) i serijom ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Luminometar se mora kalibrirati za svako ispitivanje kako bi se osigurala obnovljivost (19.). Za tu su kalibraciju dostupne rekombinantne luciferaze koje emitiraju narančastu i crvenu svjetlost.

28. U svaku jažicu ploče na kojoj se nalazi suspenzija stanica tretirana kemikalijama ili bez kemikalija prenosi se 100 µl prethodno zagrijanog reagensa za test luciferaze Tripluc® (Tripluc). Ploča se protresa deset minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Ploča se stavlja u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1). Treba pružiti obrazloženje za upotrebu drugačijih postavki, npr. ovisno o modelu luminometra koji se upotrebljava.

29. Parametri za svaku koncentraciju računaju se iz izmjerenih vrijednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednja vrijednost ± SD za IL8LA, srednja vrijednost ± SD za GAPLA, srednja vrijednost ± SD za nIL8LA, srednja vrijednost ± SD za Ind-IL8LA, srednja vrijednost ± SD za Inh-GAPLA i interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA. Definicije parametara upotrijebljenih u ovom stavku navedene su u dodacima 3.1. i 3.4.

30. Prije mjerenja razlikovanje boja u reporterskim testovima s više boja obično se postiže upotrebom detektora (luminometar i čitač ploča) koji imaju optičke filtre, kao što su filtri s oštrom graničnom crtom valne duljine (dugo ili kratko prolazni) ili pojasno propusni filtri. Koeficijente prijenosa filtara za svaku signalnu boju bioluminiscencije treba kalibrirati prije ispitivanja, u skladu s Dodatkom 3.2.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

31. Sljedeći kriteriji moraju se ispuniti u svakom ciklusu da bi se donijela pozitivna/negativna odluka:

— predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se pozitivnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije ≥ 1,4 i donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA ≥ 1,0,

— predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se negativnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije < 1,4 i/ili donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA < 1,0.

Model predviđanja

32. Ispitivane kemikalije koje daju dva pozitivna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju se kao pozitivne, dok se one koje daju tri negativna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju kao kemikalije za koje se pretpostavlja da su negativne (tablica 2.). Među kemikalijama za koje se pretpostavlja da su negativne, kemikalije koje se otapaju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 procjenjuju se kao negativne, dok kemikalije koje se ne otapaju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 ne treba razmatrati (slika 1.).

▼M8

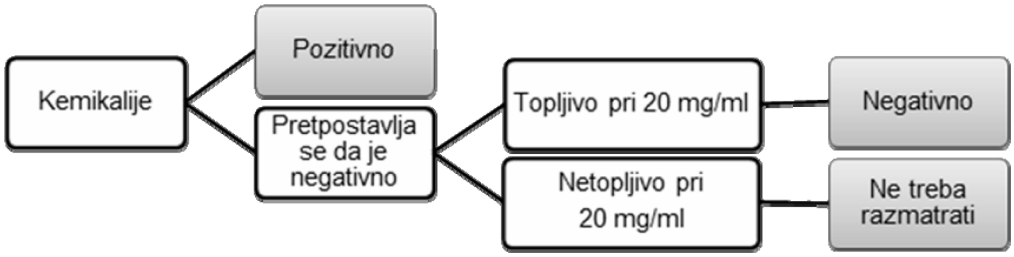
Tablica 2.

Kriteriji za identifikaciju pozitivnih i pretpostavljenih negativnih rezultata

1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus	Konačno predviđanje
Pozitivno	Pozitivno	–	–	Pozitivno
	Negativno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
Negativno	Pozitivno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
	Negativno	Pozitivno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
		Negativno	–	Pretpostavlja se da je negativno

Slika 1.

Model predviđanja za konačnu odluku



Kriteriji prihvatljivosti

33. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test IL-8 Luc:

— Ind-IL8LA treba biti veći od 5,0 pri barem jednoj koncentraciji pozitivne kontrole, 4-NBB-a, u svakom ciklusu,

— Ind-IL8LA treba biti manji od 1,4 pri bilo kojoj koncentraciji negativne kontrole, mliječne kiseline, u svakom ciklusu,

— treba odbaciti podatke s ploča za koje je GAPLA kontrolnih jažica sa stanicama i Triplucom, ali bez kemikalija, za manje od pet puta veća od GAPLA jažica koje sadržavaju samo ispitni medij (50 µl/jažici medija RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a i 50 µl/jažici medija X-VIVO™ 15),

— treba odbaciti podatke s ploča za koje je Inh-GAPLA svih koncentracija ispitivanih ili kontrolnih kemikalija manja od 0,05. U tom slučaju treba ponoviti prvo ispitivanje tako da se kao najviša konačna koncentracija ponovljenog ispitivanja upotrijebi najniža konačna koncentracija prethodnog ispitivanja.

▼M8

Izvješće o ispitivanju

34. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane kemikalije

Tvar s jednim sastojkom:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— topljivost u mediju X-VIVO^{TM} 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO^{TM} 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO^{TM} 15.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

— opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— fizički izgled, topljivost u vodi te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— topljivost u mediju X-VIVO^{TM} 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO^{TM} 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO^{TM} 15.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

— fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

▼**M8**

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola:

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,

— čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

— fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene negativne kontrole koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljenog ispitivanja,

— upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg je dobivena),

— broj serije i podrijetlo FBS-a, naziv dobavljača, broj serije crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom te broj serije reagensa Tripluc,

— broj pasaža i gustoća stanica upotrijebljenih za ispitivanje,

— metoda brojenja stanica koja je upotrijebljena za nasađivanje prije ispitivanja i mjere koje su poduzete kako bi se osigurala ujednačena distribucija broja stanica,

— upotrijebljeni luminometar (npr. model), uključujući postavke instrumenta, upotrijebljeni supstrat luciferaze te dokaz o primjerenom mjerenju luminiscencije na temelju kontrolnog ispitivanja opisanog u Dodatku 3.2.,

— postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena.

Ispitni postupak:

— broj provedenih ponavljanja i ciklusa,

— koncentracije ispitivane kemikalije, postupci primjene i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

▼**M8**

— opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,

— opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,

— opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

— mjerenje IL8LA i GAPLA,

— izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA,

— interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA,

— grafički prikaz krivulja doza – odgovor za indukciju aktivnosti luciferaze i vijabilnost,

— opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

— rasprava o rezultatima dobivenima testom IL-8 Luc,

— rasprava o rezultatima testa u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključak

LITERATURA

1. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

2. OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

3. OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

4. OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

5. van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371.–9.

6. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816.–30.

▼**M8**

7. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337.–51.

8. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275.–84.

9. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147.–155.

10. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646.–57.

11. OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

12. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286.–91.

13. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271.–9.

14. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891.–4.

15. OECD (2017). Objavit će se – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariz, Francuska.

16. OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Pariz, Francuska.

17. OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

18. JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Dostupno na: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

19. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046.–9.

▼**M8**

20. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Pariz, Francuska.

21. Ujedinjeni narodi (2015.). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Dodatak 3.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost" u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (16.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (20.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV05: vijabilnost stanica 05, tj. najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokažu Inh-GAPLA manji od 0,05.

FInSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje Ind-IL8LA. Vidjeti „Ind-IL8LA" za definiciju.

GAPLA: aktivnost stabilne crvene luciferaze (SLR) (λmax = 630 nm), koju regulira promotor gena za GAPDH i koja pokazuje vijabilnost stanica i broj živih stanica.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment integrirani pristup ispitivanju i procjeni)*: strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

II-SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje Inh-GAPLA. Vidjeti „Inh-GAPLA" za definiciju.

IL-8 (Interleukin-8): citokin izveden iz endotelnih stanica, fibroblasta, keratinocita, makrofaga i monocita koji uzrokuje kemotaksiju neutrofila i limfocita T-stanica.

IL8LA: aktivnost stabilne narančaste luciferaze (SLO) (λmax = 580 nm), koju regulira promotor gena za IL-8.

Ind-IL8LA: multiplikacijski faktor indukcije nIL8LA. Dobiva se tako da se nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s nIL8LA stanica THP-G8 koje nisu stimulirane te predstavlja aktivnost promotora gena za IL-8 koju induciraju kemikalije.

Inh-GAPLA: inhibicija GAPLA. Dobiva se tako da se GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s GAPLA stanica THP-G8 koje nisu tretirane te predstavlja citotoksičnost kemikalija.

Prag najmanje indukcije (MIT): najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

▼M8

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

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

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

nIL8LA: aktivnost luciferaze SLO koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8 (IL8LA) normalizirana aktivnošću luciferaze SLR koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH (GAPLA). To je aktivnost promotora gena za IL-8 nakon što se uzme u obzir vijabilnost stanica ili broj stanica.

nSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje nIL8LA. Vidjeti „nIL8LA” za definiciju.

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

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (16.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (16.).

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

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

SLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje IL8LA. Vidjeti „IL8LA” za definiciju.

SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje GAPLA. Vidjeti „GAPLA” za definiciju.

▼M8

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Površinski aktivna tvar: tvar, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje (TG437).

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

THP-G8: reporterska stanična linija IL-8 koja se upotrebljava u testu IL-8 Luc. Ljudska stanična linija THP-1 slična makrofagima transficirana je genima za luciferaze SLO i SLR pod kontrolom promotora gena za IL-8 i GAPDH.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (21.).

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

Valjana ispitna metoda: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu.

▼**M8**

Dodatak 3.2.

NAČELO MJERENJA AKTIVNOSTI LUCIFERAZE I UTVRĐIVANJE KOEFICIJENATA PRIJENOSA OPTIČKOG FILTRA ZA SLO I SLR

Može se upotrijebiti višereporterski ispitni sustav – Tripluc – s luminometrom za mikrotitracijske ploče koji ima višebojni detekcijski sustav na koji se može montirati optički filtar (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Kao optički filtar za mjerenje može se upotrijebiti dugo ili kratko prolazni filtar od 600 do 620 nm ili pojasno propusni filtar od 600 do 700 nm.

Mjerenje dvobojnih luciferaza optičkim filtrom

U ovom se primjeru upotrebljava Phelios AB-2350 (ATTO). Taj je luminometar opremljen dugo prolaznim filtrom od 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtar 1) za razdvajanje luminiscencije SLO (λmax = 580 nm) i SLR (λmax = 630 nm).

Kako bi se utvrdili koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filtar od 600 nm, prvo se upotrebom pročišćenih enzima luciferaze SLO i SLR mjeri: i. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR bez filtra (F0), ii. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR koja je prošla kroz dugo prolazni filtar od 600 nm (filtar 1) te se iii. računaju koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filtar od 600 nm za SLO i SLR navedeni u nastavku.

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

Ako se intenzitet SLO i SLR u ispitnom uzorku definiraju kao O i R: i. intenzitet svjetlosti bez filtra (potpuno optički) F0 i ii. intenzitet svjetlosti koja se emitira kroz dugo prolazni filtar od 600 nm (filtar 1) F1 opisuju se kako je prikazano u nastavku.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Te se formule mogu preoblikovati na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Zatim se upotrebom izračunanih faktora propusnosti (κO_{R60} i κR_{R60}) te izmjerenih vrijednosti F0 i F1 mogu izračunati vrijednosti O i R na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Materijali i metode za utvrđivanje faktora propusnosti

1. *Reagensi*

Jedinstveni pročišćeni enzimi luciferaze:

liofilizirani pročišćeni enzim SLO;

liofilizirani pročišćeni enzim SLR;

(koji su za validacijsku studiju dobiveni od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan sa staničnom linijom THP-G8).

Reagens za test:

reagens za test luciferaze Tripluc® (na primjer od TOYOBO Cat#MRA-301).

Medij: za test luciferaze (30 ml, pohranjeno na temperaturi od 2 do 8 °C)

Reagens	Konc.	Konačna konc. u mediju	Potrebna količina
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2. *Priprema otopine enzima*

Otopiti liofilizirani pročišćeni enzim luciferaze u epruveti dodavanjem 200 µl pufera Tris/HCl od 10 ~ 100 mM ili Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) obogaćenog s 10 % (w/v) glicerola, podijeliti otopinu enzima u alikvote od 10 µl u epruvetama za jednokratnu upotrebu od 1,5 ml i pohraniti ih u zamrzivač na temperaturi od – 80 °C. Zamrznuta otopina enzima može se upotrebljavati do najviše šest mjeseci. Pri upotrebi dodati 1 ml medija za test luciferaze (RPMI-1640 s 10 % FBS-a) u sve epruvete u kojima se nalaze otopine enzima (razrijeđena otopina enzima) i držati ih na ledu kako bi se spriječila deaktivacija.

3. *Mjerenje bioluminiscencije*

Odmrznuti reagens za test luciferaze Tripluc® (Tripluc) i držati ga na sobnoj temperaturi u vodenoj kupelji ili na sobnoj temperaturi. Uključiti luminometar 30 minuta prije početka mjerenja kako bi se omogućila stabilizacija fotomultiplikatora. Prenijeti 100 µl razrijeđene otopine enzima na crnu ploču s 96 jažica (s ravnim dnom) (referentni uzorak SLO u #B1, #B2, #B3, a referentni uzorak SLR u #D1, #D2, #D3). Zatim pipetom prenijeti 100 µl unaprijed zagrijanog Tripluca u svaku jažicu ploče koja sadržava razrijeđenu otopinu enzima. Ploču protresati deset minuta na sobnoj temperaturi (približno 25 °C) u jedinici za miješanje. Ako se u otopini u jažicama pojave mjehurići, treba ih ukloniti. Ploču staviti u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1).

Koeficijent prijenosa optičkog filtra izračunan je na sljedeći način:

Koeficijent prijenosa (SLO (κO_{R60})) = (#B1 od F1 + #B2 od F1 + #B3 od F1) / (#B1 od F0 + #B2 od F0 + #B3 od F0)

▼**M8**

Koeficijent prijenosa (SLR (κR_{R60})) = (#D1 od F1 + #D2 od F1 + #D3 od F1) / (#D1 od F0 + #D2 od F0 + #D3 od F0)

Izračunani faktori propusnosti upotrebljavaju se za sva mjerenja koja se obavljaju istim luminometrom.

Kontrola kvalitete opreme

Treba upotrebljavati postupke opisane u protokolu za IL-8 Luc (18.).

▼M8

Dodatak 3.3.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za devet tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa IL-8 Luc te za najmanje osam od devet tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti (izabrane tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože) dobiti vrijednosti koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom IL-8 Luc. Isto tako, za test IL-8 Luc dostupni su objavljeni referentni podaci (6. i 1.).

Tablica 1.:

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa IL-8 Luc

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Topljivost u mediju X-VIVO15 pri 20 mg/ml	Predviđanje *in vivo* ([1])	Predviđanje testom IL-8 Luc ([2])	Referentni raspon (μg/ml) ([3])	
						CV_{05} ([4])	MIT u testu IL-8 Luc ([5])
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50-00-0	Tekućina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	250–290	60–250
Etilendiamin	107-15-3	Tekućina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	500–700	0,1–0,4
Etilenglikol-dimetakrilat	97-90-5	Tekućina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2000	0,04–0,1
4-alilanisol (estragol)	140-67-0	Tekućina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2 000	0,01–0,07
Streptomicin sulfat	3810-74-0	Kruta tvar	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima
([1]) Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (19.).
([2]) Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 6.).
([3]) CV_{05} i MIT u testu IL-8 Luc izračunani su upotrebom topljivosti u vodi koja je dobivena programom EPI Suite™.
([4]) CV_{05}: najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokažu Inh-GAPLA manji od 0,05.
([5]) MIT: najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

▼M8

Dodatak 3.4.

INDEKSI L KRITERIJI PROSUDBE

nIL8LA (nSLO-LA)

J-to ponavljanje (j = 1 – 4) i-te koncentracije (i = 0 – 11) mjeri se za IL8LA (SLO-LA) i GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, koja se naziva nIL8LA (nSLO-LA), definira se kao:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

To je osnovna mjerna jedinica u ovom testu.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Multiplikacijski faktor povećanja uprosječene nIL8LA (nSLO-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u usporedbi s vrijednošću pri koncentraciji od 0, Ind-IL8LA, primarna je mjera ovog testa. Taj se omjer bilježi sljedećom formulom:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}$$

Glavni laboratorij predložio je da vrijednost od 1,4 odgovara pozitivnom rezultatu za ispitanu kemikaliju. Ta se vrijednost temelji na istraživanju prijašnjih podataka glavnog laboratorija. Tim za upravljanje podacima zatim je upotrebljavao tu vrijednost u svim fazama validacijske studije. Primarni ishod, Ind-IL8LA, omjer je dvije aritmetičke sredine, kako je prikazano u jednadžbi.

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI)

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI) koji se temelji na omjeru može se procijeniti kako bi se pokazala preciznost te mjere primarnog ishoda. Donja granica intervala pouzdanosti od 95 % $\geq$ 1 ukazuje na to da je nIL8LA s i-tom koncentracijom značajno veća od vrijednosti u kontroli s otapalom. Interval pouzdanosti od 95 % može se izvesti na nekoliko načina. U ovoj je studiji upotrijebljena metoda poznata kao Fiellerov teorem. Taj se teorem intervala pouzdanosti od 95 % dobiva prema sljedećoj formuli:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

pri čemu je.

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \text{nIL8LA}_{0j}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$ je percentil od 97,5 centralne t-distribucije s vrijednošću ν stupnja slobode, pri čemu je

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je omjer uprosječene GAPLA (SLR-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u usporedbi s vrijednošću za kontrolu s otapalom, a bilježi se kao:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

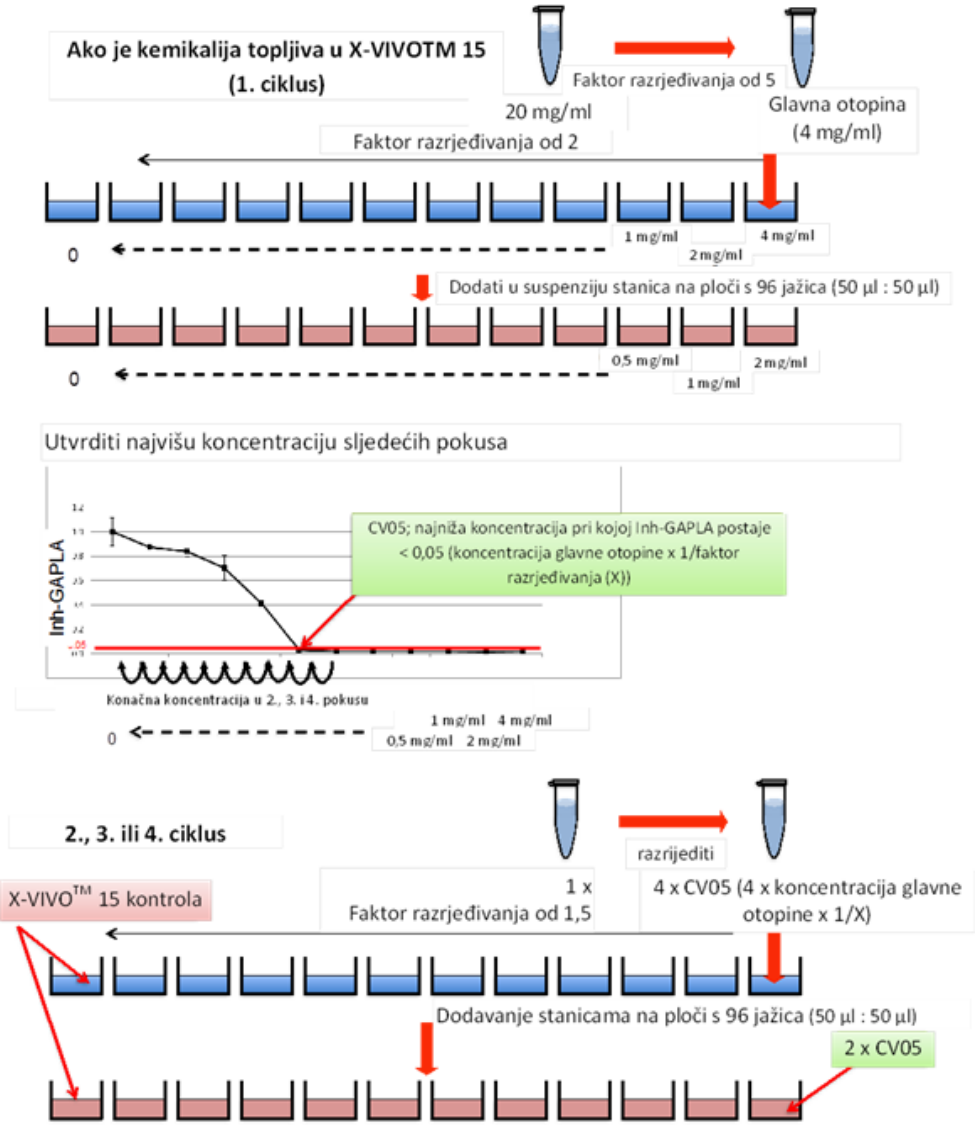
Budući da je GAPLA nazivnik vrijednosti nIL8LA, iznimno male vrijednosti uzrokuju velike varijacije vrijednosti nIL8LA. Stoga se vrijednosti Ind-IL8LA s iznimno malom vrijednosti Inh-GAPLA (manja od 0,05) mogu smatrati slabom preciznošću.

▼**M8**

Dodatak 3.5.

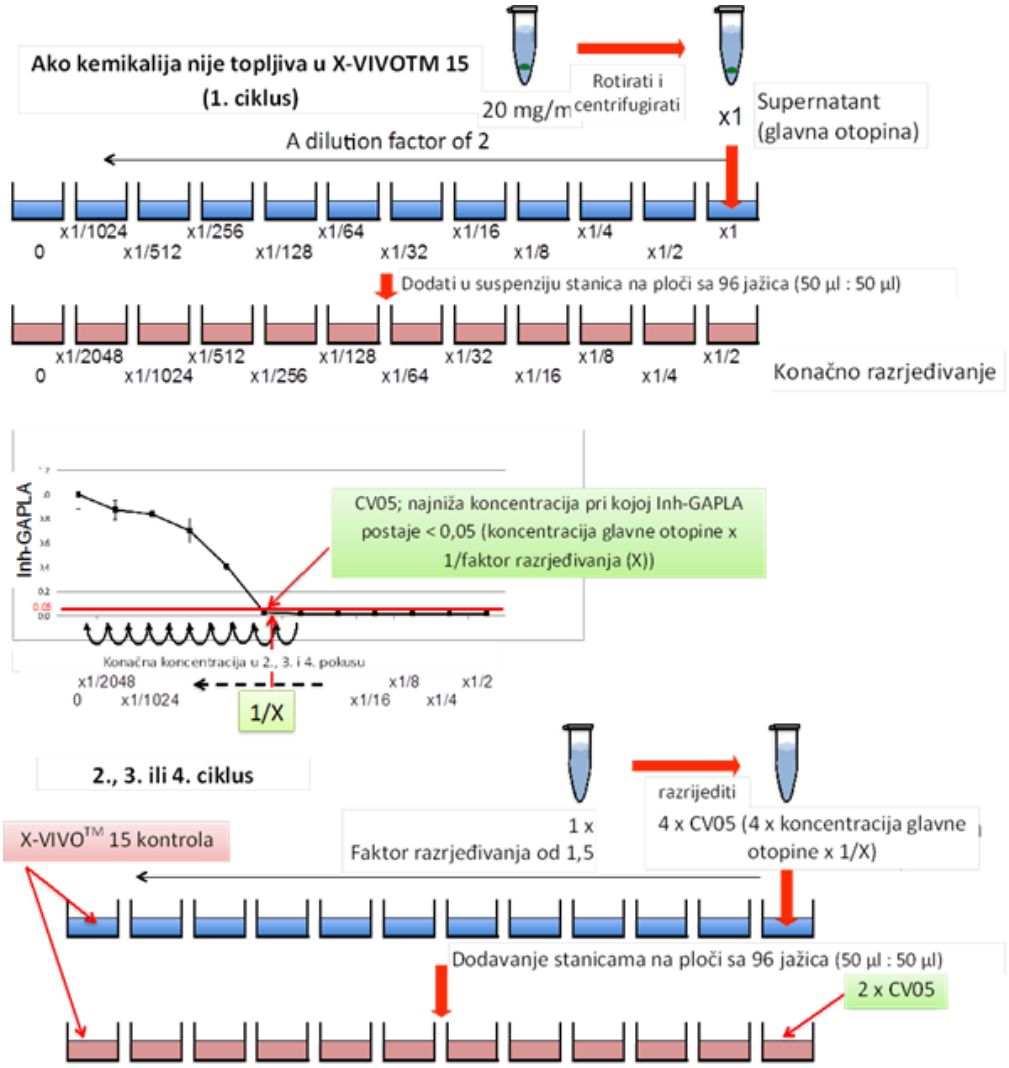
PLAN METODA ZA OTAPANJE KEMIKALIJA ZA TEST IL-8 LUC

(a) Za kemikalije koje se otapaju u mediju X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



▼**M8**

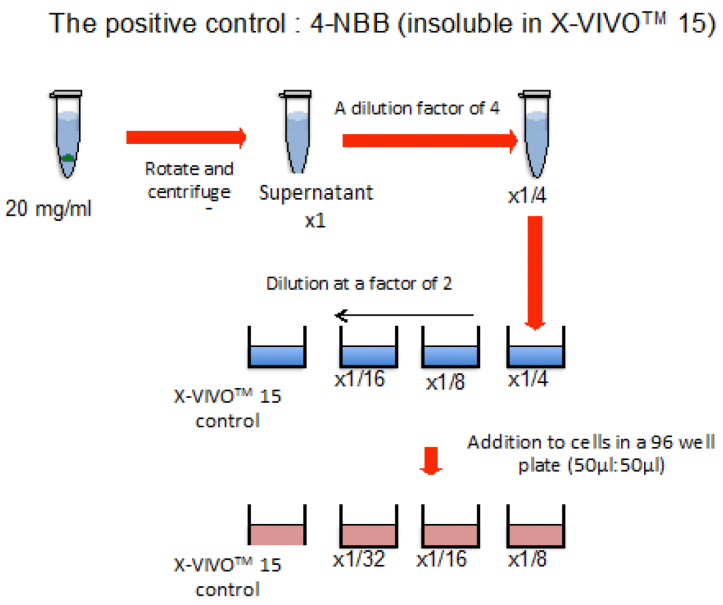
(b) Za kemikalije koje nisu topljive u mediju X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml



▼**M8**

Dodatak 3.6.

PLAN METODE ZA OTAPANJE 4-NBB-A ZA POZITIVNU KONTROLU U TESTU IL-8 LUC;



▼B

DIO C: METODE ZA ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI

SADRŽAJ

C.1.	AKUTNA TOKSIČNOST ZA RIBE
C.2.	TEST AKUTNE IMOBILIZACIJE *DAPHNIA SP.*
C.3.	TEST INHIBICIJE RASTA SLATKOVODNIH ALGI I CIJANOBAKTERIJA
C.4.	ODREĐIVANJE „LAKE” BIORAZGRADIVOSTI
I. DIO	OPĆENITO
II. DIO	TEST OPADANJA DOC-a (metoda C.4.-A)
DIO III.	IZMIJENJENI TEST PRETRAŽIVANJA OECD (metoda C.4.-B)
IV. DIO	TEST RAZVIJANJA CO_2 (metoda C.4.-C)
V. DIO	MANOMETRIJSKO-RESPIROMETRIJSKI TEST (metoda C.4.-D)
DIO VI.	TEST SA ZATVORENIM BOCAMA (metoda C.4.-E)
DIO VII.	TEST M.I.T.I. (metoda C.4.-F)
C.5.	RAZGRADNJA – BIOKEMIJSKA POTROŠNJA KISIKA
C.6.	RAZGRADNJA – KEMIJSKA POTROŠNJA KISIKA
C.7.	RAZGRADNJA – ABIOTIČKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KAO FUNKCIJA PH
C.8.	TOKSIČNOST ZA GUJAVICE
C.9.	BIORAZGRADNJA – ZAHN-WELLENSOV TEST
C.10.	SIMULACIJSKI TEST AEROBNOG PROČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA C.10-A: JEDINICE S AKTIVNIM MULJEM - C.10-B: BIOFILMOVI
C.11.	AKTIVNI MULJ, TEST INHIBICIJE DISANJA (OKSIDACIJA UGLJIKA I AMONIJAKA)
C.12.	BIORAZGRADNJA – IZMIJENJENI TEST SCAS
C.13.	BIOAKUMULACIJA U RIBAMA: VODENO IZLAGANJE ILI IZLAGANJE KROZ HRANU
C.14.	TEST RASTA JUVENILNIH RIBA
C.15.	TEST KRATKOTRAJNE TOKSIČNOSTI NA RIBAMA U STADIJU EMBRIJA I MLAĐI SA ŽUMANJČANOM VREĆICOM
C.16.	MEDONOSNE PČELE – ISPITIVANJE AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI
C.17.	MEDONOSNE PČELE – ISPITIVANJE AKUTNE KONTAKTNE TOKSIČNOSTI
C.18.	ŠARŽNO ISPITIVANJE ADSORPCIJE/DESORPCIJE U RAVNOTEŽI

▼B

C.19.	PROCJENA KOEFICIJENTA ADSORPCIJE (K_{CO}) NA TLO I KANALIZACIJSKI MULJ PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOLOGIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)
C.20.	ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA VRSTI *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MIKROORGANIZMI KOJI ŽIVE U TLU: TEST PRETVORBE DUŠIKA
C.22.	MIKROORGANIZMI KOJI ŽIVE U TLU: TEST PRETVORBE UGLJIKA
C.23.	AEROBNA I ANAEROBNA PRETVORBA U TLU
C.24.	AEROBNA I ANAEROBNA PRETVORBA U SUSTAVIMA VODENOG SEDIMENTA
C.25.	AEROBNA MINERALIZACIJA U POVRŠINSKOJ VODI – SIMULACIJSKI TEST BIORAZGRADNJE
C.26.	TEST INHIBICIJE RASTA VRSTA *LEMNA*
C.27.	TEST TOKSIČNOSTI TRZALACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA SA SEDIMENTOM OBRAĐENIM SPIKINGOM
C.28.	TEST TOKSIČNOSTI TRZALACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA S VODOM OBRAĐENOM SPIKINGOM
C.29.	LAKA BIORAZGRADIVOST - CO_2 U ZAČEPLJENIM POSUDAMA (TEST PLINSKOG PROSTORA (HEADSPACE))
C.30.	BIOAKUMULACIJA U KOPNENIM OLIGOHETIMA
C.31.	TEST NA KOPNENOM BILJU: ISPITIVANJE NICANJA I RASTA KLIJANACA
C.32.	TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA ENHITREJAMA
C.33.	TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA GUJAVICAMA (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)
C.34.	ODREĐIVANJE INHIBICIJE DJELOVANJA ANAEROBNIH BAKTERIJA – SMANJENJE PROIZVODNJE PLINA IZ ANAEROBNE RAZGRADNJE (OTPADNIH VODA) MULJA
C.35.	ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA *LUMBRICULUS* U SUSTAVU SEDIMENT-VODA UPORABOM SEDIMENTA OBRAĐENOG SPIKINGOM
C.36.	ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI U TLU ZA GRABEŽLJIVU GRINJU (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*)
C.37.	21-DNEVNI TEST NA RIBAMA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA NA ESTROGENSKU I ANDROGENSKU AKTIVNOST I INHIBICIJU AROMATAZE
C.38.	ANALIZA METAMORFOZE VODOZEMACA
C.39.	ISPITIVANJE REPRODUKCIJE SKOKUNA U TLU

▼B

C.40.	TOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE UNUTAR ŽIVOTNOG CIKLUSA TRZALACA (*CHIRONOMIDAE*) U VODI IZ SEDIMENTA S VODOM OBRAĐENOM SPIKINGOM ILI SA SEDIMENTOM OBRAĐENIM SPIKINGOM
C.41.	ISPITIVANJE SPOLNOG RAZVOJA RIBA
C.42.	BIORAZGRADIVOST U MORSKOJ VODI
C.43.	ANAEROBNA BIORAZGRADIVOST ORGANSKIH TVARI U RAZGRAĐENOM MULJU: MJERENJEM PROIZVODNJE PLINA
C.44.	ISPIRANJE U STUPCIMA TLA
C.45.	PROCJENA EMISIJA U OKOLIŠ IZ DRVA TRETIRANOG ZAŠTITNIM SREDSTVIMA: LABORATORIJSKA METODA ZA DRVENE PREDMETE U DOTICAJU SA SLATKOM ILI MORSKOM VODOM KOJI NISU U NJU URONJENI
C.46.	BIOAKUMULACIJA U BENTIČKIM OLIGOHETIMA IZ SEDIMENTA
C.47.	ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA RIBAMA U RANOM ŽIVOTNOM STADIJU
C.48.	KRATKOROČNI REPRODUKCIJSKI TEST NA RIBAMA
C.49.	ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA RIBLJIM EMBRIJIMA
C.50.	ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SUSTAVU BEZ SEDIMENTA
C.51.	ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SUSTAVU VODA-SEDIMENT
C.52.	ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA PRODULJENOJ GENERACIJI MEDAKE (MEOGRT)
C.53.	TEST RASTA I RAZVOJA VODOZEMACA U FAZI LIČINKI (LAGDA)

▼B

C.1. AKUTNA TOKSIČNOST ZA RIBE

1. METODA

1.1. UVOD

Svrha ovog testa je odrediti akutnu letalnu toksičnost tvari za ribe u slatkoj vodi. Kao pomoć u odabiru najprikladnije ispitne metode (statička, polustatička ili protočna) poželjno je imati informacije o topljivosti u vodi, tlaku pare, kemijskoj stabilnosti, konstantama disocijacije i biorazgradivosti tvari, u mjeri u kojoj je to moguće, kako bi se osigurala zadovoljavajuća stabilnost koncentracija ispitivane tvari u razdoblju ispitivanja.

Kod planiranja ispitivanja i tumačenja rezultata treba uzeti u obzir i dodatne informacije (npr. strukturna formula, stupanj čistoće, vrsta i postotak značajnih nečistoća, prisutnost i količine dodataka (aditiva) i podjelni koeficijent n-oktanol/voda).

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Akutna toksičnost je raspoznatljiv štetni učinak izazvana u organizmu u kratkom vremenu (dani) izlaganja tvari. U ovom se testu akutna toksičnost izražava kao medijan smrtonosne koncentracije (LC_{50}), a to je koncentracija u vodi koja ubija 50 % ispitne serije riba u neprekinutom vremenu izlaganja koje treba navesti.

Sve koncentracije ispitivane tvari navode se kao omjer masa/volumen (miligrami po litri). One se također mogu izraziti i kao maseni udjeli (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENTNE TVARI

Ispitivanjem referentne tvari može se dokazati da se odgovor ispitivane vrste nije značajno promijenio u uvjetima laboratorijskog ispitivanja.

Za ovo ispitivanje nisu utvrđene referentne tvari.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Granično se ispitivanje može provesti sa 100 mg po litri da bi se dokazalo da je LC_{50} viši od te koncentracije.

Ribe se tijekom 96 sati izlažu ispitivanoj tvari, koja se dodaje u vodu u određenom rasponu koncentracija. Smrtnost se bilježi barem u razmacima od 24 sata i, ako je to moguće, izračunaju se koncentracije koje ubijaju 50 % riba (LC_{SO}) u svakom vremenu promatranja.

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

Kriteriji kakvoće vrijede za granično ispitivanje i za potpunu ispitnu metodu.

Smrtnost u kontrolama do kraja ispitivanja ne smije biti viša od 10 % (ili jedna riba ako se koristi manje od deset).

Koncentracija otopljenog kisika mora stalno biti iznad 60 % vrijednosti zasićenja kisikom.

▼B

Koncentracije ispitivane tvari se tijekom ukupnog trajanja ispitivanja moraju održavati na razini 80 % početnih koncentracija.

Za tvari koje se lako otapaju u ispitnom mediju dajući stabilne otopine, tj. tvari koje neće u značajnoj mjeri ishlapiti, razgraditi se, hidrolizirati ili adsorbirati, može se uzeti da je početna koncentracija istovjetna nazivnoj koncentraciji. Treba dokazati da su koncentracije tijekom ispitivanja u svakom trenutku bile na predviđenoj razini i da su zadovoljeni kriteriji kakvoće.

Kod tvari koje:

i. su slabo topljive u ispitnom mediju; ili

ii. mogu tvoriti stabilne emulzije ili disperzije; ili

iii. nisu stabilne u vodenim otopinama,

uzet će se da je početna koncentracija ona koncentracija koja je izmjerena u otopini (odnosno, ako to tehnički nije izvedivo, u vodenom stupcu) na početku ispitivanja. Koncentracija se određuje nakon razdoblja uravnoteženja, ali prije uvođenja ispitnih riba.

U svakom od ovih slučajeva treba za vrijeme ispitivanja provesti dodatna mjerenja kako bi se potvrdile stvarne koncentracije izlaganja odnosno usklađenost s kriterijima kakvoće.

Odstupanja pH vrijednosti ne smiju biti viša od 1 jedinice.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

Mogu se koristiti tri vrste postupka:

Statičko ispitivanje:

ispitivanje toksičnosti gdje nema protoka ispitne otopine. (Otopine ostaju nepromijenjene tijekom ukupnog trajanja ispitivanja.)

Polustatičko ispitivanje:

ispitivanje bez protoka ispitne otopine, ali uz redovito obnavljanje čitave količine ispitne otopine nakon dužih razdoblja (npr. 24 sata).

Protočno ispitivanje:

toksikološko ispitivanje gdje se voda u ispitnim komorama stalno obnavlja i ispitivana se kemikalija prenosi s vodom koja sa koristi za obnavljanje ispitnog medija.

1.6.1. **Reagensi**

1.6.1.1. *Otopine ispitivanih tvari*

Radne otopine potrebne jakosti pripremaju se otapanjem tvari u deioniziranoj vodi odnosno vodi u skladu s 1.6.1.2.

Odabrane ispitne koncentracije pripremaju se razrjeđivanjem radne otopine. Ako se ispituju visoke koncentracije, tvar se može izravno otopiti u vodi za razrjeđivanje.

▼B

Tvari u pravilu treba ispitivati samo do granice topljivosti. Kod nekih tvari (npr. tvari koje imaju nisku topljivost u vodi ili visoki P_{ow} i tvari koje u vodi ne tvore pravu otopinu već stabilnu disperziju) prihvatljivo je korištenje ispitne koncentracije iznad granice topljivosti kako bi se dobila najviša topljiva/stabilna koncentracija. Ipak, važno je da ta koncentracija inače ne remeti ispitni sustav (npr. film tvari na površini vode koji sprečava oksigenaciju vode itd.).

Kao pomoć u pripremi radnih otopina tvari niske topljivosti u vodi odnosno da bi se olakšalo dispergiranje tih tvari u ispitnom mediju, može se koristiti ultrazvučno raspršivanje, organska otapala, emulgatori ili dispergenti. Ako se koriste ovakve pomoćne tvari, sve ispitne koncentracije moraju sadržavati istu količinu pomoćne tvari i treba uvesti dodatne kontrolne ribe i izložiti ih istoj koncentraciji pomoćne tvari kao ribe u ispitnom nizu. Koncentracija tih pomoćnih tvari treba biti što je moguće niža, a u svakom slučaju ne smije prelaziti 100 mg po litri ispitnog medija.

Ispitivanje treba provesti bez podešavanja pH vrijednosti. Ako ima naznaka da je došlo do značajne promjene pH, savjetuje se da se ispitivanje ponovi uz podešavanje pH i navedu rezultati. U tom slučaju pH vrijednost radne otopine treba podesiti na pH vrijednost vode za razrjeđivanje, osim ako postoje posebni razlozi da se to ne učini. Pritom treba po mogućnosti koristiti HCl i NaOH. Podešavanje pH vrijednosti treba obaviti na način da ne dođe do značajne promjene koncentracije ispitivane tvari u radnoj otopini. Ako podešavanje izazove kemijsku reakciju ili fizičko taloženje ispitivanog spoja, to treba navesti u izvješću o ispitivanju.

1.6.1.2. *Voda za držanje i voda za razrjeđivanje*

Može se koristiti tekuća voda za piće (koja nije onečišćena potencijalno štetnim koncentracijama klora, teških metala i drugih tvari), kvalitetna prirodna voda ili obrađena voda (vidjeti Dodatak 1.). Prednost se daje vodi ukupne tvrdoće između 10 i 250 mg po litri (kao $CaCO_3$) s pH od 6,0 do 8,5.

1.6.2. **Aparatura**

Sva aparatura mora biti izrađena od kemijski inertnog materijala:

— automatski sustav razrjeđivanja (za protočno ispitivanje),

— mjerač kisika,

— oprema za određivanje tvrdoće vode,

— odgovarajući uređaj za regulaciju temperature,

— mjerač pH vrijednosti.

1.6.3. **Ispitne ribe**

Ribe trebaju biti zdrave i ne smiju pokazivati vidljive malformacije.

▼B

Vrstu treba odabrati na temelju praktičnih kriterija, kao što su dobra raspoloživost tijekom čitave godine, lakoća održavanja, prikladnost za ispitivanje, relativna osjetljivost na kemikalije te svi bitni ekonomski, biološki i okolišni čimbenici. Prilikom odabira riblje vrste treba također voditi računa o potrebi za usporedivošću dobivenih podataka i postojećem međunarodnom usklađivanju (1).

Popis preporučenih ribljih vrsta za provedbu ovog testa nalazi se u Dodatku 2.; preferirane vrste su zebrica i kalifornijska pastrva.

1.6.3.1. *Držanje*

Sve ispitne ribe trebaju po mogućnosti potjecati iz istog nasada i biti slične dužine i dobi. Ribe treba držati najmanje 12 dana u sljedećim uvjetima:

punjenje:

ovisno o postupku (recirkulacija ili protok) i ribljoj vrsti,

voda:

vidjeti 1.6.1.2.,

svjetlost:

osvjetljenje od 12 do 16 sati dnevno,

koncentracija otopljenog kisika:

najmanje 80 % vrijednosti zasićenja kisikom,

hranjenje:

tri puta tjedno ili svakog dana – prestaje 24 sata prije početka ispitivanja.

1.6.3.2. *Smrtnost*

Smrtnost se bilježi nakon 48-satnog razdoblja prilagodbe, uz primjenu sljedećih kriterija:

— iznad 10 % populacije u sedam dana:

čitava serija se odbacuje,

— između 5 i 10 % populacije:

razdoblje držanja produžuje se na još sedam dana.

Ako se nakon tog više ne zabilježi smrtnost, serija je prihvatljiva; u protivnome se mora odbaciti,

— manje od 5 % populacije:

prihvaćanje serije.

1.6.4. **Prilagodba**

Sve ribe moraju prije korištenja biti najmanje sedam dana izložene vodi iste kakvoće i temperature kakva će se koristiti u ispitivanju.

▼B

1.6.5. **Ispitni postupak**

Prije glavnog ispitivanja može se provesti preliminarno ispitivanje za određivanje raspona kako bi se pribavile informacije o rasponu koncentracija koji će se koristiti u glavnom ispitivanju.

Uz ispitni niz treba provesti jednu kontrolu s vodom za razrjeđivanje te, prema potrebi, jednu kontrolu s pomoćnom tvari.

Ovisno o fizikalnim i kemijskim svojstvima ispitivanog spoja, treba odabrati statičko, polustatičko ili protočno ispitivanje, kako bi kriteriji kakvoće bili zadovoljeni.

Ribe se izlažu tvari kako je ovdje opisano:

— trajanje: 96 sati,

— broj životinja: najmanje sedam po koncentraciji,

— bazeni: prikladne zapremnine s obzirom na preporučeno punjenje,

— punjenje: za statičko i polustatičko ispitivanje preporučuje se maksimalna količina punjenja od 1 g po litri; kod protočnih sustava prihvatljiva je i veća količina punjenja,

— ispitna koncentracija: najmanje pet koncentracija koje se razlikuju za stalni faktor ne viši od 2,2 i koje u najvećoj mogućoj mjeri obuhvaćaju područje od 0 do 100 % smrtnosti,

— voda: vidjeti 1.6.1.2.,

— svjetlost: osvjetljenje od 12 do 16 sati dnevno,

— temperatura: ovisno o vrsti (Dodatak 2.), ali u granicama ± 1 °C tijekom jednog ispitivanja,

— koncentracija otopljenog kisika: najmanje 60 % vrijednosti zasićenja kisikom pri odabranoj temperaturi,

— hranjenje: nema.

Ribe se pregledavaju nakon prva dva do četiri sata te barem u razmacima od 24 sata. Ribe se smatraju mrtvima ako ne reagiraju na dodir u području korijena repa i ako nisu vidljivi pokreti disanja. Mrtve ribe treba ukloniti čim se uoče i zabilježiti smrtnost. Treba voditi evidenciju vidljivih anomalija (npr. gubitak ravnoteže, promjene u načinu plivanja, disanju, pigmentaciji itd.).

Mjerenja pH vrijednosti, otopljenog kisika i temperature treba provoditi svakodnevno.

Granično ispitivanje

Granično se ispitivanje može provesti sa 100 mg po litri primjenom postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi da bi se dokazalo da je LC_{50} viši od te koncentracije.

Ako se zbog prirode tvari ne može postići koncentracija od 100 mg po litri u ispitnoj vodi, granično ispitivanje treba provesti s koncentracijom koja je jednaka topljivosti tvari (ili najvišoj koncentraciji koja daje stabilnu disperziju) u mediju koji se koristi (vidjeti također točku 1.6.1.1.).

▼B

Granično ispitivanje treba provesti na 7 do 10 riba, uz isti broj riba u kontroli odnosno kontrolama. (Prema binomnom poučku, ako se koristi 10 riba s nultom smrtnošću, tada je pouzdanost da je LC_{50} viši od koncentracije primijenjene u graničnom ispitivanju jednaka 99,9 %. Odustnost smrtnosti kod 7, 8 ili 9 riba ukazuje na to da je LC_{50} viši od primijenjene koncentracije s pouzdanošću od najmanje 99 %.)

Kod pojave smrtnosti treba provesti potpuno istraživanje. Treba zabilježiti sve uočene subletalne učinke.

2. **PODACI I VREDNOVANJE**

Postotak smrtnosti u svakom vremenu u kojemu se bilježe zapažanja (24, 48, 72 i 96 sati) treba prikazati na logaritamskom papiru vjerojatnosti u ovisnosti o koncentraciji i to za svako preporučeno vrijeme izlaganja.

Kad god je to moguće, za svako vrijeme promatranja treba procijeniti LC_{50} i granice pouzdanosti ($p = 0,05$) primjenom standardnih postupaka; te vrijednosti treba zaokružiti na jedno ili najviše dva značajna mjesta (primjeri zaokruživanja na dva mjesta: 170 za 173,5; 0,13 za 0,127; 1,2 za 1,21).

U slučaju da je nagib krivulje koncentracija/odgovor preoštar za izračun LC_{50}, dovoljna je grafička procjena te vrijednosti.

Ako dvije uzastopne koncentracije u omjeru 2,2 daju samo 0 i 100 % smrtnosti, te su dvije vrijednosti dovoljne da se pokaže područje u kojemu se nalazi LC_{50}.

Ako je primijećeno da se stabilnost ili homogenost ispitivane tvari ne može održati, to treba navesti u izvješću o ispitivanju i rezultate tumačiti s oprezom.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

Izvješće o ispitivanju po mogućnosti sadrži sljedeće informacije:

— podaci o ispitnim ribama (znanstveni naziv, soj, dobavljač, moguće prethodne obrade, veličina i broj riba pri svakoj ispitnoj koncentraciji),

— izvor vode za razrjeđivanje i značajna kemijska svojstva (pH, tvrdoća, temperatura),

— u slučaju tvari koje su slabo topljive u vodi: metoda pripreme radne i ispitnih otopina,

— koncentracija pomoćnih tvari,

— popis korištenih koncentracija i sve raspoložive informacije o stabilnosti ispitivane kemikalije u ispitnoj otopini u tim koncentracijama,

— ako se provode kemijske analize, primijenjene metode i dobiveni rezultati,

— rezultati graničnog ispitivanja, ako se provodi,

— razlozi za odabir ispitnog postupka i pojedinosti tog postupka (npr. statički, polustatički, doziranje, brzina protoka, dozračivanje, količina punjenja itd.),

▼B

— opis ispitne opreme,

— režim rasvjete,

— koncentracije otopljenog kisika, pH vrijednosti i temperature ispitnih otopina svaka 24 sata,

— dokazi da su ispunjeni kriteriji kakvoće,

— tablica iz koje je vidljiva kumulativna smrtnost pri svakoj koncentraciji i u kontroli (i u kontroli s pomoćnom tvari, ako je potrebna) u svakom preporučenom vremenu promatranja,

— graf krivulje koncentracija/odgovor na kraju ispitivanja,

— po mogućnosti, vrijednosti LC_{50} u svakom preporučenom vremenu promatranja (s granicama pouzdanosti 95 %),

— statistički postupci primijenjeni za određivanje vrijednosti LC_{50},

— ako se koristi referentna tvar, rezultati koji su dobiveni,

— najviša ispitna koncentracija koja ne izaziva smrtnost u razdoblju ispitivanja,

— najniža ispitna koncentracija koja je izazvala 100 %-tnu smrtnost u razdoblju ispitivanja.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan-Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden -Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T.and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96,99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634,1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Dodatak 1.

Obrađena voda

Primjer prikladne vode za razrjeđivanje

Sve kemikalije moraju biti analitički čiste.

Voda treba biti kvalitetna destilirana voda ili deionizirana voda vodljivosti manje od 5 μScm^{-1}.

Aparatura za destilaciju vode ne smije sadržavati bakrene dijelove.

Radne otopine

$CaCl_2 . 2H_2O$ (kalcijev klorid dihidrat): 11,76 g

otopiti u vodi i nadopuniti vodom do 1 litre.

$MgSO_4 . 7H_2O$ (magnezijev sulfat heptahidrat): 4,93 g

otopiti u vodi i nadopuniti vodom do 1 litre.

$NaHCO_3$ (natrijev hidrogenkarbonat): 2,59 g

otopiti u vodi i nadopuniti vodom do 1 litre.

KCl (kalijev klorid): 0,23 g

otopiti u vodi i nadopuniti vodom do 1 litre.

Obrađena voda za razrjeđivanje

Pomiješati po 25 ml svake od četiri radne otopine i nadopuniti vodom do 1 litre.

Dozračivati dok koncentracija otopljenog kisika ne dosegne vrijednost zasićenja kisikom.

pH treba biti 7,8 ± 0,2.

pH se prema potrebi podešava uz pomoć NaOH (natrijev hidroksid) ili HCl (klorovodična kiselina).

Ovako pripremljena voda za razrjeđivanje ostavi se da stoji 12 sati i ne smije se više dozračivati.

Zbroj iona Ca i Mg u ovoj otopini je 2,5 mmol po litri. Omjer iona Ca i Mg je 4:1, a iona Na i K je 10:1. Ukupni alkalitet ove otopine je 0,8 mmol po litri.

Moguća odstupanja u pripremi vode za razrjeđivanje ne smiju promijeniti sastav i svojstva vode.

▼B

Dodatak 2.

Preporučene riblje vrste za ispitivanje

Preporučene vrste	Preporučeno područje ispitnih temperatura (°C)	Preporučena ukupna dužina ispitne životinje (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) zebrica	20 do 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) debeloglava gaovica	20 do 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) šaran	20 do 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck i Schlege 1850) medaka	20 do 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) gupi	20 do 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) plavoškrga sunčanica	20 do 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) kalifornijska pastrva	12 do 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) jez	20 do 24	6,0 ± 2,0

Skupljanje

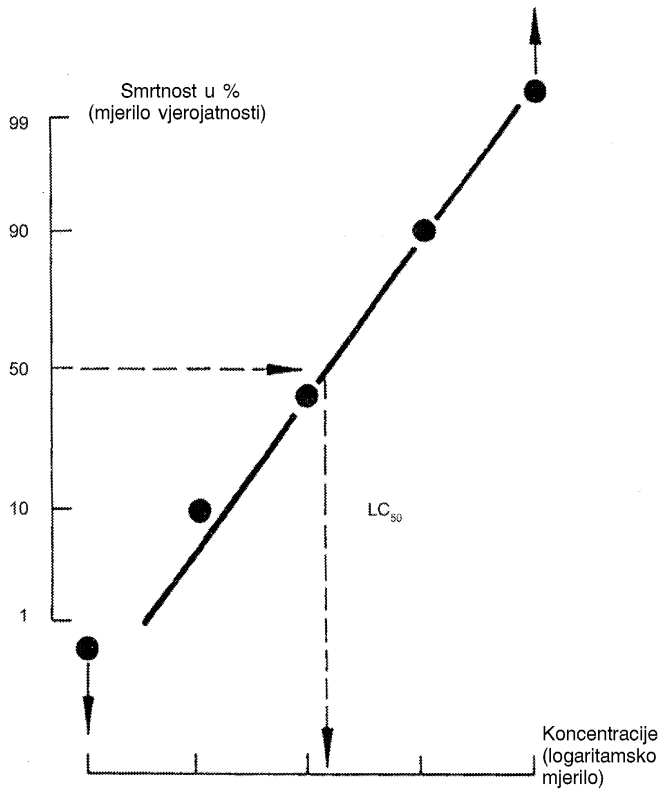
Gore navedene ribe su jednostavne za uzgoj i/ili su široko raspoložive tijekom čitave godine. One se mogu uzgajati i kultivirati na ribljim farmama ili u laboratorijskim uvjetima, uz nadzor bolesti i nametnika, kako bi se dobile zdrave ispitne životinje poznatog podrijetla. Ove su ribe raspoložive u mnogim dijelovima svijeta.

▼B

Dodatak 3.

Primjer krivulje koncentracija – postotak smrtnosti

Primjer određivanja LC_{50} uz pomoć logaritamskog papira vjerojatnosti



▼B

C.2. TEST AKUTNE IMOBILIZACIJE DAPHNIA SP.

1. METODA

Ova metoda ispitivanja akutne imobilizacije istovjetna je smjernici OECD TG 202 (2004.).

1.1. UVOD

U ovoj je metodi opisan test akutne toksičnosti za ocjenjivanje učinaka kemikalija na dafnije. Postojeće ispitne metode korištene su u mjeri u kojoj je to bilo moguće (1)(2)(3).

1.2. DEFINICIJE

U kontekstu ove metode koriste se sljedeće definicije:

EC_{50}: procijenjena koncentracija koja izaziva nepokretnost 50 % dafnija unutar navedenog vremena izlaganja. Ako se koristi druga definicija, treba je navesti zajedno s izvorom.

Nepokretnost: smatra se da su životinje nepokretne ako nisu sposobne plivati unutar 15 sekundi od nježnog mućkanja ispitne posude (čak i onda ako još uvijek mogu micati antenama).

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Mlade dafnije, koje su na početku ispitivanja mlađe od 24 sata, izlažu se nizu koncentracija ispitivane tvari u razdoblju od 48 sati. Nepokretnost se bilježi nakon 24 sata i 48 sati i uspoređuje s kontrolnim vrijednostima. Rezultati se analiziraju da bi se izračunao EC_{50} nakon 48 sati (za definicije vidjeti odjeljak 1.2.). Određivanje EC_{50} nakon 24 sata je fakultativno.

1.4. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Treba biti poznata topljivost u vodi i tlak pare ispitivane tvari i biti raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama s dokumentiranim iskorištenjem i granicom određivanja. Osim toga, korisno je imati informacije o strukturnoj formuli, čistoći tvari, stabilnosti u vodi ili na svjetlosti, P_{ow} i rezultatima ispitivanja na laku biorazgradivost (vidjeti metodu C.4.).

Napomena: smjernice za ispitivanje tvari koje se teško ispituju zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava navode se u (4).

1.5. REFERENTNA TVAR

Ispitivanjem referentne tvari na EC_{50} može se provjeriti pouzdanost ispitnih uvjeta. Za to se preporučuju toksikanti koji se koriste u međunarodnim prstenastim testovima (1)(5) ([1]). Test(ove) s referentnom tvari trebalo bi provoditi po mogućnosti svaki mjesec, a najmanje dvaput godišnje.

([1]) Prema rezultatima tih međulaboratorijskih ispitivanja i u skladu s tehničkim ispravkom ISO 6341 EC_{50} – 24 h kalijevog dikromata ($K_2Cr_2O_7$) nalazi se u području između 0,6 mg/l i 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KRITERIJI KAKVOĆE

Da bi ispitivanje bilo valjano, trebaju biti zadovoljeni sljedeći provedbeni kriteriji:

— u kontrolama, uključujući kontrolu sa sredstvom za otapanje, ne smije biti nepokretno više od 10 % dafnija,

— koncentracija otopljenog kisika u kontrolnim i ispitnim posudama na kraju ispitivanja treba biti ≥ 3 mg/l.

Napomena: Da bi bio zadovoljen prvi kriterij, nepokretnost i drugi znakovi bolesti odnosno stresa, primjerice promjena boje, neobično ponašanje kao što je zarobljenost na površini vode, ne bi smjeli biti vidljivi kod više od 10 % kontrolnih dafnija.

1.7. OPIS ISPITNE METODE

1.7.1. **Aparatura**

Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u dodir s ispitnim otopinama treba biti u cijelosti izrađena od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Ispitne posude su u pravilu staklene epruvete ili laboratorijske čaše; njih treba očistiti prije svake uporabe primjenom standardnih laboratorijskih postupaka. Ispitne posude treba lagano prekriti kako bi se smanjio gubitak vode uslijed isparavanja i spriječio ulazak prašine u otopine. Hlapljive tvari treba ispitivati u potpuno napunjenim zatvorenim posudama koje su dovoljno velike da razina kisika ne postane ograničavajuća odnosno preniska (vidjeti odjeljak 1.6. i prvi stavak odjeljka 1.8.3.).

Osim toga, treba koristiti sljedeću opremu, djelomično ili u cijelosti: mjerač kisika (s mikroelektrodom ili drugim prikladnim uređajem za mjerenje otopljenog kisika u uzorcima malog volumena); mjerač pH vrijednosti; odgovarajući uređaj za regulaciju temperature; oprema za određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC); oprema za određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK); oprema za određivanje tvrdoće itd.

1.7.2. **Ispitni organizam**

Daphnia magna Straus je preferirana ispitna vrsta, iako se u ovom testu mogu koristiti i druge prikladne vrste *Daphnia* (npr. *Daphnia pulex*). Na početku ispitivanja životinje trebaju biti mlađe od 24 sata; da bi se ograničila varijabilnost, nikako se ne preporučuje korištenje potomstva iz prvog legla. Dafnije trebaju potjecati iz zdravog nasada (tj. ne smiju pokazivati znakove stresa, kao što je visoka smrtnost, prisutnost mužjaka i efipija, zakašnjelo davanje prvog potomstva, životinje promijenjene boje itd.). Svi organizmi koji se koriste u određenom ispitivanju trebaju potjecati iz kultura dobivenih iz istog nasada dafnija. Matične životinje treba držati u uzgojnim uvjetima (svjetlost, temperatura, medij) koji su slični uvjetima ispitivanja. Ako će se u ispitivanju koristiti uzgojni medij koji se ne koristi u uobičajenom uzgoju dafnija, treba predvidjeti razdoblje aklimatizacije uoči ispitivanja. U tu se svrhu uzgojne dafnije prije početka ispitivanja drže u vodi za razrjeđivanje na ispitnoj temperaturi najmanje 48 sati.

▼B

1.7.3. **Voda za držanje i voda za razrjeđivanje**

Prirodna voda (površinska ili podzemna voda), obrađena voda i deklorirana voda iz slavine prihvatljive su kao voda za držanje odnosno voda za razrjeđivanje ako dafinije u njima mogu preživjeti vrijeme trajanja uzgoja, aklimatizacije i ispitivanja bez znakova stresa. Prikladna ispitna voda je svaka voda koja ima kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje iz Dodatka 1. Kakvoća vode mora ostati nepromijenjena u razdoblju ispitivanja. Obrađena se voda može pripremiti dodavanjem određenih količina reagensa priznate analitičke čistoće deioniziranoj ili destiliranoj vodi. Primjeri obrađene vode navode se u (1)(6) i u Dodatku 2. Valja napomenuti da kod ispitivanja tvari koje sadrže metale treba izbjegavati medije koji sadrže poznata kelatna sredstva, kao što su mediji M4 i M7 iz Dodatka 2. pH vrijednost treba biti u području od 6 do 9. Za vrstu *Daphnia magna* preporučuje se tvrdoća između 140 i 250 mg/l (kao $CaCO_3$), dok kod drugih vrsta *Daphnia* može biti prikladna i manja tvrdoća. Voda za razrjeđivanje se prije uporabe u ispitivanju može dozračivati dok koncentracija otopljenog kisika ne dosegne točku zasićenja.

Ako se koristi prirodna voda, parametre kakvoće treba mjeriti najmanje dvaput godišnje odnosno svaki put kad se posumnja da su se ta svojstva značajno promijenila (vidjeti prethodni stavak i Dodatak 1.). Osim toga, treba obavljati mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ako se koristi deklorirana voda iz slavine, poželjna je dnevna analiza klora. Ako se voda za razrjeđivanje uzima iz izvora površinske ili podzemne vode, treba mjeriti vodljivost i ukupni organski ugljik (TOC) odnosno kemijsku potrošnju kisika (KPK).

1.7.4. **Ispitne otopine**

Ispitne otopine odabranih koncentracija obično se pripremaju razrjeđivanjem radne otopine. Radne otopine treba po mogućnosti pripremiti otapanjem ispitivane tvari u vodi za razrjeđivanje. Uporabu otapala, emulgatora i dispergenata treba što je moguće više izbjegavati. Ipak, takvi su spojevi u određenim slučajevima nužni da bi se dobila prikladna koncentracija radne otopine. Smjernice za prikladna otapala, emulgatore i dispergente navode se u (4). U svakom slučaju, ispitivana tvar u ispitnim otopinama ne smije prijeći granicu topljivosti u vodi za razrjeđivanje.

Ispitivanje treba provesti bez podešavanja pH vrijednosti. Ako pH ne ostane u području 6 – 9, treba provesti drugo ispitivanje i pritom pH vrijednost radne otopine podesiti na pH vode za razrjeđivanje prije dodavanja ispitne tvari. Podešavanje pH treba obaviti na način da ne dođe do značajne promjene koncentracije radne otopine i da se ne izazove kemijska reakcija ili taloženje ispitivane tvari. Prednost se daje HCl i NaOH.

▼B

1.8. POSTUPAK

1.8.1. **Uvjeti izlaganja**

1.8.1.1. *Ispitne skupine i kontrole*

Ispitne posude se napune odgovarajućom količinom vode za razrjeđivanje i otopina ispitivane tvari. Omjer volumena zraka i vode u posudama u ispitnoj i kontrolnoj skupini treba biti jednak. Nakon toga se dafnije stavljaju u ispitne posude. Treba upotrijebiti najmanje 20 životinja po ispitnoj koncentraciji i za kontrole, po mogućnosti podijeljenih u četiri skupine po pet životinja. Potrebno je najmanje 2 ml ispitne otopine po životinji (tj. 10 ml za pet dafnija po ispitnoj posudi). Ako koncentracija ispitivane tvari nije stabilna, ispitivanje se može provesti uz pomoć polustatičkog sustava s obnavljanjem ili protočnog sustava.

Uz ispitni niz treba ispitati jedan kontrolni niz s vodom za razrjeđivanje te, prema potrebi, jedan kontrolni niz sa sredstvom za otapanje.

1.8.1.2. *Ispitne koncentracije*

Ako nisu raspoloživi podaci o toksičnosti ispitivane tvari, može se provesti preliminarno ispitivanje kako bi se odredio raspon koncentracija za glavno ispitivanje. U tu se svrhu dafnije izlože nizu koncentracija ispitivane tvari s velikim razmakom između koncentracija. Svakoj ispitnoj koncentraciji treba izložiti 5 dafnija u trajanju od 48 sati ili manje, a ponavljanja nisu potrebna. Vrijeme izlaganja se može skratiti (npr. 24 sata ili manje) ako se prikladni podaci za određivanje raspona mogu dobiti u kraćem vremenu.

Treba koristiti najmanje pet ispitnih koncentracija. Koncentracije trebaju biti raspoređene u geometrijskom nizu uz faktor koji po mogućnosti nije viši od 2,2. Ako se koristi manje od pet koncentracija, treba navesti obrazloženje. Poželjno je da se pri najvišoj ispitanoj koncentraciji postigne 100 %-tna nepokretnost i da najniža ispitana koncentracija ne pokaže vidljiv učinak.

1.8.1.3. *Uvjeti inkubacije*

Temperatura treba biti u području između 18 °C i 22 °C i tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati više od ± 1 °C. Preporučuje se ciklus od 16 sati svjetlosti i 8 sati tame. Prihvatljiva je i potpuna tama, posebno ako je ispitivana tvar nestabilna na svjetlosti.

Ispitne posude se tijekom ispitivanja ne smiju dozračivati. Ispitivanje se obavlja bez podešavanja pH. Dafnije se za vrijeme ispitivanja ne smiju hraniti.

1.8.1.4. *Trajanje*

Ispitivanje traje 48 sati.

1.8.2. **Promatranja**

Svaku ispitnu posudu treba provjeriti na prisutnost nepokretnih dafnija 24 i 48 sati nakon početka ispitivanja (za definicije vidjeti odjeljak 1.2.). Osim nepokretnosti, treba navesti svako neuobičajeno ponašanje ili izgled.

▼B

1.8.3. **Analitička mjerenja**

Otopljeni kisik i pH mjere se na početku i kraju ispitivanja u kontroli odnosno kontrolama te u najvišoj koncentraciji ispitivane tvari. Koncentracija otopljenog kisika u kontrolama mora zadovoljavati kriterij valjanosti (vidjeti odjeljak 1.6.). U pravilu, pH tijekom jednog ispitivanja ne bi smio odstupati više od 1,5 jedinica. Temperatura se obično mjeri u kontrolnim posudama ili u okolnom zraku i treba je po mogućnosti neprekidno bilježiti za vrijeme ispitivanja, a barem na početku i kraju ispitivanja.

Koncentraciju ispitivane tvari treba mjeriti barem u najnižoj i najvišoj ispitnoj koncentraciji na početku i kraju ispitivanja (4). Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Ipak, ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane tvari tijekom ukupnog trajanja ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti i na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima.

1.9. GRANIČNO ISPITIVANJE

Granično se ispitivanje može provesti sa 100 mg/l ispitivane tvari ili do granice topljivosti ispitivane tvari u ispitnom mediju (ovisno o tome što je manje) primjenom postupaka opisanih u ovoj metodi da bi se dokazalo da je EC_{50} viši od te koncentracije. Granično ispitivanje treba provesti na 20 dafnija (po mogućnosti podijeljenih u četiri skupine po pet) uz isti broj životinja u kontroli odnosno kontrolama. Kod pojave nepokretnosti treba provesti potpuno istraživanje. Treba zabilježiti svako uočeno neuobičajeno ponašanje.

2. **PODACI**

Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku, navodeći za svaku ispitnu skupinu i kontrolu broj dafnija koji je korišten i nepokretnost pri svakom promatranju. Postotak nepokretnih životinja nakon 24 i 48 sati se grafički prikaže u ovisnosti o ispitnim koncentracijama. Podaci se analiziraju odgovarajućim statističkim metodama (npr. analiza vjerojatnosti itd.) kako bi se mogli izračunati nagibi krivulja i EC_{50} s granicama pouzdanosti 95 % ($p = 0,05$) (7)(8).

Ako se na dobivene podatke na mogu primijeniti standardne metode za izračunavanje EC_{50}, treba koristiti najvišu koncentraciju koja ne izaziva nepokretnost i najnižu koncentraciju koja izaziva 100 %-tnu nepokretnost kao aproksimaciju za EC_{50} (koji se smatra geometrijskom sredinom tih dviju koncentracija).

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće:

ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

▼B

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući čistoću.

Ispitna vrsta:

— izvor i vrsta *Daphnia*, izvorni dobavljač (ako je poznat) i uvjeti uzgoja (uključujući izvor, vrstu i količinu hrane, učestalost hranjenja).

Ispitni uvjeti:

— opis ispitnih posuda: vrsta posuda, volumen otopine, broj dafnija po ispitnoj posudi, broj ispitnih posuda (ponavljanja) po koncentraciji,

— metode pripreme radnih i ispitnih otopina, uključujući korištenje otapala i dispergenata, upotrijebljene koncentracije,

— podaci o vodi za razrjeđivanje: izvor i značajke kakvoće (pH, tvrdoća, omjer Ca/Mg, omjer Na/K, alkalitet, vodljivost itd.); sastav obrađene vode (ako se koristi),

— uvjeti inkubacije: temperatura, intenzitet svjetlosti i ciklusi, otopljeni kisik, pH itd.

Rezultati:

— broj i postotak dafnija koje su postale nepokretne odnosno pokazuju bilo kakve štetne učinke (uključujući neuobičajeno ponašanje) u kontrolama i svim ispitnim skupinama u svakom vremenu promatranja i priroda zapaženih učinaka,

— rezultati i datum ispitivanja s referentnom tvari, ako su raspoloživi,

— nazivne ispitne koncentracije i rezultat svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane tvari u ispitnim posudama; također treba navesti iskorištenje metode i granicu određivanja,

— sva fizikalno-kemijska mjerenja temperature, pH i otopljenog kisika tijekom ispitivanja,

— EC_{50} za nepokretnost nakon 48 sati s intervalima pouzdanosti i grafovima prilagođenog modela koji je korišten za izračun, nagibi krivulja doza-odgovor i njihova standardna greška; statistički postupci primijenjeni za određivanje EC_{50}; (ove podatke treba navesti i za nepokretnost nakon 24 sata, ako se mjeri),

— objašnjenje svakog odstupanja od ispitne metode i je li ono utjecalo na rezultate.

4. **REFERENCE**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. str. 65-84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Dodatak 1.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Koncentracija
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼B

Dodatak 2.

PRIMJERI PRIKLADNE OBRAĐENE ISPITNE VODE

Ispitna voda ISO (1)

Radne otopine (pojedinačna tvar)		Za pripremu obrađene vode u 1 litru vode (*) treba dodati sljedeće količine radnih otopina
Tvar	Količina koja se dodaje u 1 litru vode (*)	
Kalcijev klorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnezijev sulfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natrijev bikarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kalijev klorid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda prikladne čistoće npr. deionizirana, destilirana ili pročišćena obrnutom osmozom, čija vodljivost po mogućnosti ne prelazi 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Medij Elendt M7 i M4

Aklimatizacija na medij Elendt M7 i M4

Neki su laboratoriji imali problema s izravnim prenošenjem dafnija u medije M 4 i M7. Ipak, određeni je uspjeh postignut s postupnom aklimatizacijom tj. premještanjem iz vlastitog medija u 30 %-tni Elendt, zatim u 60 %-tni Elendt i zatim u 100 %-tni Elendt. Ponekad je potrebno razdoblje aklimatizacije i do jednog mjeseca.

Priprema

Element u tragovima

Najprije se pripreme odvojene radne otopine (I) pojedinih elemenata u tragovima u vodi prikladne čistoće npr. deionizirana, destilirana ili pročišćena obrnutom osmozom. Iz tih različitih radnih otopina (I) pripremi se druga pojedinačna radna otopina (II) koja sadrži sve elemente u tragovima (kombinirana otopina) tj.:

Radna(-e) otopina(-e) I (pojedinačna tvar)	Količina koja se dodaje u vodu (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Za pripremu kombinirane radne otopine II u vodu treba dodati sljedeću količinu radne otopine I (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20000-struko	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20000-struko	1,0	0,25
LiCl	6 120	20000-struko	1,0	0,25

▼B

Radna(-e) otopina(-e) I (pojedinačna tvar)	Količina koja se dodaje u vodu (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Za pripremu kombinirane radne otopine II u vodu treba dodati sljedeću količinu radne otopine I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20000-struko	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20000-struko	1,0	0,25
NaBr	320	20000-struko	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20000-struko	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20000-struko	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20000-struko	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20000-struko	1,0	1,0
Kl	65	20000-struko	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20000-struko	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20000-struko	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2000-struko	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2000-struko	—	—

Otopine Na 2 EDTA i $FeSO_4$ pripreme se odvojeno, sjedine i odmah obrade u autoklavu.

Pritom nastaje:

2 l otopine Fe-EDTA		1000-struko	20,0	5,0

Medij M4 i M7

Mediji M4 i M7 pripremaju se pomoću radne otopine II, makronutrijenata i vitamina na sljedeći način:

	Količina koja se dodaje u vodu (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Količina radne otopine II koja se dodaje kod pripreme medija (ml/l)	
			M4	M7
Radna otopina II (kombinirani elementi u tragovima)		20-struko	50	50
Radne otopine makronutrijenata (pojedinačna tvar)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1000-struko	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2000-struko	0,5	0,5
KCl	58 000	10000-struko	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1000-struko	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5000-struko	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10000-struko	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10000-struko	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10000-struko	0,1	0,1

▼B

	Količina koja se dodaje u vodu (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Količina radne otopine II koja se dodaje kod pripreme medija (ml/l)	
			M4	M7
Kombinirana vitaminska radna otopina	—	10000-struko	0,1	0,1
Kombinirana vitaminska radna otopina priprema se dodavanjem 3 vitamina u 1 litru vode, kako je ovdje prikazano:				
Tiamin-hidroklorid	750	10000-struko		
Cijanokobalamin (B_{12})	10	10000-struko		
Biotin	7,5	10000-struko		

Kombinirana vitaminska radna otopina čuva se zamrznuta u malim alikvotima. Vitamini se dodaju u medij neposredno prije uporabe.

N.B.: Da bi se izbjeglo taloženje soli kod pripreme kompletnog medija, alikvote radnih otopina treba dodati u oko 500 – 800 ml deionizirane vode i zatim nadopuniti do 1 litre.

N. B.: Medij M4 prvi se puta navodi u Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, str. 25-33.

▼M6

C.3. TEST INHIBICIJE RASTA SLATKOVODNIH ALGI I CIJANOBAKTERIJA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 201 (2006., prilog ispravljen 2011.). Bilo je utvrđeno da je ispitnu metodu potrebno proširiti kako bi se uključile još neke vrste i ispunili zahtjevi ocjenjivanja opasnosti i razvrstavanja kemikalija. Revizija je provedena na temelju širokog praktičnog iskustva, znanstvenog napretka u području toksikoloških istraživanja s algama i široke regulatorne primjene koja je uslijedila nakon njezina donošenja.

2. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

3. Svrha je ispitivanja odrediti učinke kemikalije na rast slatkovodnih mikroalgi i/ili cijanobakterija. Eksponencijalno rastući ispitni organizmi izlažu se ispitivanoj kemikaliji u šaržnim kulturama, u pravilu tijekom 72 sata. Unatoč relativno kratkom trajanju ispitivanja, mogu se ocijeniti učinci na nekoliko generacija.

4. Odgovor sustava sastoji se u smanjenju rasta niza kultura algi (ispitnih jedinica) koje su izložene različitim koncentracijama ispitivane kemikalije. Odgovor se ocjenjuje kao funkcija koncentracije izlaganja u odnosu na prosječni rast ponavljanih, neizloženih kontrolnih kultura. Da bi se u punoj mjeri izrazila reakcija sustava na toksične učinke (optimalna osjetljivost), kulturama treba prije mjerenja smanjenja specifične brzine rasta ostaviti dovoljno vremena da postignu neograničeni eksponencijalni rast, uz dovoljno nutrijenata i neprekidno osvjetljenje.

5. Rast i inhibicija rasta kvantificiraju se mjerenjima biomase algi u ovisnosti o vremenu. Biomasa algi definirana je kao suha masa po volumenu, npr. mg algi / l ispitne otopine. Ipak, suhu je masu teško mjeriti pa se stoga primjenjuju zamjenski parametri. Od zamjenskih parametara najčešće se upotrebljava broj stanica. Ostali su zamjenski parametri volumen stanica, fluorescencija, optička gustoća itd. Mora biti poznat faktor pretvorbe za prevođenje izmjerenih zamjenskih parametara u biomasu.

6. Krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta, izražena kao logaritamsko povećanje biomase (prosječna specifična brzina rasta) u razdoblju izlaganja. Iz prosječnih specifičnih brzina rasta zabilježenih u nizu ispitnih otopina određuje se koncentracija koja izaziva određeno x-postotno smanjenje brzine rasta (npr. 50 %), koja se izražava kao E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

7. U ovoj se ispitnoj metodi upotrebljava i prirast kao dodatna varijabla odgovora koja je potrebna da bi se ispunili određeni regulatorni zahtjevi u nekim državama. Prirast se definira kao biomasa na kraju razdoblja izlaganja umanjena za biomasu na početku razdoblja izlaganja. Iz prirasta zabilježenog u nizu ispitnih otopina izračunava se koncentracija koja izaziva određeno x-postotno smanjenje prirasta (npr. 50 %), koja se izražava kao E_yC_x (npr. E_yC_{50}).

8. Osim toga, može se statistički odrediti najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC).

▼**M6**

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

9. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati informacije o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturna formula, čistoća, stabilnost na svjetlosti, stabilnost u uvjetima ispitivanja, svojstva apsorpcije svjetlosti, pKa i rezultati istraživanja pretvorbe, uključujući biorazgradivost u vodi.

10. Treba biti poznata topljivost u vodi, koeficijent razdjeljenja oktanol/voda (P_{ow}) i tlak pare ispitivane kemikalije te biti raspoloživa validirana metoda za kvantifikaciju kemikalije u ispitnim otopinama s dokumentiranim iskorištenjem i granicom detekcije.

VALJANOST ISPITIVANJA

11. Da bi ispitivanje bilo valjano, mora ispuniti sljedeće kriterije:

— Biomasa u kontrolnim kulturama mora se eksponencijalno povećati barem za faktor 16 u razdoblju ispitivanja od 72 sata. To odgovara specifičnoj brzini rasta od 0,92 dan^{-1}. Kod vrsta koje se najčešće upotrebljavaju brzina rasta uglavnom je znatno viša (vidjeti Dodatak 2.). Ovaj kriterij možda neće biti zadovoljen ako se upotrebljavaju vrste koje rastu sporije od onih koje su navedene u Dodatku 2. U tom slučaju razdoblje ispitivanja treba produžiti koliko je potrebno da se u kontrolnim kulturama dobije barem šesnaesterostruki rast, uz eksponencijalni rast tijekom cjelokupnog razdoblja ispitivanja. Razdoblje ispitivanja može se skratiti na najmanje 48 sati da bi se održao neograničeni eksponencijalni rast tijekom ispitivanja, pod uvjetom da je postignut minimalni faktor povećanja 16.

— Srednji koeficijent varijacije etapnih specifičnih brzina rasta (dani 0 – 1, 1 – 2, 2 – 3, za ispitivanje koje traje 72 sata) u kontrolnim kulturama (vidjeti Dodatak 1. pod „koeficijent varijacije”) ne smije biti viši od 35 %. Za izračunavanje etapne specifične brzine rasta vidjeti stavak 49. Ovaj kriterij vrijedi za srednju vrijednost koeficijenata varijacije izračunanih za ponavljanja kontrolnih kultura.

— Kod ispitivanja s vrstama *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Desmodesmus subspicatus* koeficijent varijacije prosječnih specifičnih brzina rasta u ponavljanjima s kontrolnim kulturama tijekom ukupnog razdoblja ispitivanja ne smije biti viši od 7 %. Kod ostalih ispitnih vrsta koje se rjeđe upotrebljavaju ta vrijednost ne smije biti viša od 10 %.

REFERENTNA KEMIKALIJA

12. Jedna ili više referentnih kemikalija, kao što je 3,5-diklorfenol koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom ispitivanju usporedivosti (1), mogu se ispitati radi provjere postupka. Kao referentna kemikalija za zelene alge može se upotrijebiti i kalijev dikromat. Poželjno je da se referentna kemikalija ispita najmanje dvaput godišnje.

PRIMJENJIVOST TESTA

13. Ova se ispitna metoda najlakše primjenjuje kod kemikalija topljivih u vodi za koje se može pretpostaviti da će u ispitnim uvjetima ostati u vodi. Opisani postupak ponekad je potrebno izmijeniti (npr. zatvoreni sustav, kondicioniranje ispitnih posuda) kad se ispituju kemikalije koje su hlapljive,

▼M6

vrlo adsorptivne, obojene, slabo topljive u vodi ili kemikalije koje mogu utjecati na raspoloživost nutrijenata ili minerala u ispitnom mediju. Smjernice za neke izmjene mogu se pronaći u literaturi pod (2), (3) i (4).

OPIS ISPITNE METODE

Aparatura

14. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u dodir s ispitnim otopinama moraju biti u cijelosti izrađeni od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Aparaturu je potrebno temeljito oprati kako organski i anorganski onečišćivači ne bi utjecali na rast algi ili na sastav ispitnih otopina.

15. Ispitne su posude u pravilu staklene tikvice dovoljnih dimenzija da se osigura potreban volumen kulture za mjerenja tijekom ispitivanja i dovoljan prijenos mase CO_2 iz atmosfere (vidjeti stavak 30.). Valja napomenuti da volumen tekućine mora biti dovoljan za analitička određivanja (vidjeti stavak 37.).

16. Osim toga, potrebna je sljedeća oprema (djelomično ili u cijelosti):

— Inkubator za uzgoj: preporučuje se ormar ili komora u kojoj se može održavati odabrana temperatura inkubacije na ± 2 °C.

— Instrumenti za mjerenje svjetlosti: važno je napomenuti da metoda mjerenja intenziteta svjetlosti, a posebno vrsta prijamnika (senzora), može utjecati na izmjerenu vrijednost. Mjerenja po mogućnosti treba provoditi s pomoću sferičnog (4 π) prijamnika (koji reagira na izravnu i reflektiranu svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) ili prijamnika 2 π (koji reagira na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine).

— Aparatura za određivanje biomase algi. Broj stanica, najčešće upotrebljavani zamjenski parametar za biomasu algi, može se odrediti s pomoću elektroničkog brojača čestica, mikroskopa s komorom za brojenje ili protočnog citometra. Ostali se zamjenski parametri za biomasu mogu mjeriti s pomoću protočnog citometra, fluorimetra, spektrofotometra i kolorimetra. Korisno je izračunati faktor pretvorbe broja stanica u masu suhe tvari. Da bi se kod mjerenja spektrofotometrom dobile upotrebljive mjerne vrijednosti pri niskim koncentracijama biomase, ponekad je potrebno upotrijebiti kivete s putom svjetlosti od najmanje 4 cm.

Ispitni organizmi

17. Može se upotrijebiti nekoliko vrsta slobodnoplivajućih mikroalgi i cijanobakterija. Za sojeve navedene u Dodatku 2. dokazano je da su prikladni za ispitni postupak iz ove ispitne metode.

18. Ako se upotrebljavaju druge vrste, treba navesti soj i/ili podrijetlo. Treba se uvjeriti da se eksponencijalni rast odabranih ispitnih algi može održati tijekom cjelokupnog razdoblja ispitivanja u odgovarajućim ispitnim uvjetima.

Uzgojni medij

19. Preporučuju se dva alternativna uzgojna medija, OECD i AAP. Sastav tih medija prikazan je u Dodatku 3. Valja napomenuti da ta dva medija imaju različitu početnu pH-vrijednost i puferski kapacitet (za regulaciju povećanja pH-vrijednosti). Stoga se kod ispitivanja mogu dobiti različiti rezultati ovisno o mediju koji se upotrebljava, posebno kad se ispituju ionizirajuće kemikalije.

▼M6

20. U određenim je slučajevima potrebno izmijeniti uzgojni medij, npr. kad se ispituju metali i kelatna sredstva ili kad se ispitivanje provodi s različitim pH-vrijednostima. Uporabu izmijenjenog medija treba detaljno opisati i obrazložiti (3) (4).

Početna koncentracija biomase

21. Početna biomasa mora biti jednaka u svim ispitnim kulturama i mora biti dovoljno niska da se može postići eksponencijalni rast tijekom čitavog razdoblja inkubacije bez bojazni da bi se mogle iscrpiti zalihe nutrijenata. Početna biomasa ne smije biti viša od 0,5 mg/l suhe mase. Preporučuju se sljedeće početne koncentracije stanica:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ stanica/ml
Desmodesmus subspicatus	$2 - 5 \times 10^3$ stanica/ml
Navicula pelliculosa	10^4 stanica/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 stanica/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ stanica/ml

Koncentracije ispitivane kemikalije

22. Raspon koncentracija u kojemu se mogu očekivati učinci može se odrediti na temelju rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Za konačno, glavno ispitivanje treba odabrati najmanje pet koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu uz faktor do najviše 3,2. Kod ispitivanih kemikalija čija je krivulja koncentracija-odgovor ravna ponekad je opravdano upotrebljavati viši faktor. Niz koncentracija trebao bi po mogućnosti obuhvatiti područje u kojemu se javlja inhibicija rasta algi od 5 do 75 %.

Ponavljanja i kontrole

23. U planu ispitivanja treba predvidjeti po tri ponavljanja pri svakoj ispitnoj koncentraciji. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se promijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Broj kontrolnih ponavljanja mora biti najmanje tri, a u idealnom slučaju dvostruko veći od broja ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju.

24. Za analitička određivanja koncentracija ispitivane kemikalije može se pripremiti zaseban niz ispitnih otopina (vidjeti stavke 36. i 38.).

25. Ako se za otapanje ispitivane kemikalije upotrebljava otapalo, potrebno je predvidjeti dodatne kontrole koje sadržavaju istu koncentraciju otapala kao ispitne kulture.

Priprema kulture inokuluma

26. Kulturu inokuluma u ispitnom mediju treba pripremiti dva do četiri dana prije početka ispitivanja, kako bi se ispitne alge prilagodile uvjetima ispitivanja i bile u fazi eksponencijalnog rasta u trenutku kad se primjenjuju za inokulaciju ispitnih otopina. Biomasu algi treba prilagoditi tako da kultura inokuluma može eksponencijalno rasti do početka ispitivanja. Kulturu inokuluma potrebno je inkubirati u istim uvjetima kao ispitne kulture.

▼M6

Mjerenjem povećanja biomase u kulturi inokuluma treba se uvjeriti da je rast u granicama normale za ispitivani soj u uvjetima uzgoja. Primjer postupka uzgoja kulture algi opisan je u Dodatku 4. Ponekad može biti potrebno provesti još jedan korak razmnožavanja kulture inokuluma da bi se izbjegla istodobna dijeljenja stanica za vrijeme ispitivanja.

Priprema ispitnih otopina

27. Sve ispitne otopine moraju sadržavati istu koncentraciju uzgojnog medija i istu početnu biomasu ispitnih algi. Ispitne otopine odabranih koncentracija uglavnom se pripremaju miješanjem radne otopine ispitivane kemikalije s uzgojnim medijem i kulturom inokuluma. Radne otopine u pravilu se pripremaju otapanjem kemikalije u ispitnom mediju.

28. Ako je ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi, kao nosači za dodavanje kemikalije u ispitni medij mogu se upotrebljavati otapala, npr. aceton, t-butil alkohol i dimetilformamid (2) (3). Koncentracija otapala ne smije biti viša od 100 μm/l i mora biti jednaka u svim kulturama u ispitnom nizu (uključujući kontrole).

Inkubacija

29. Ispitne se posude začepe zrakopropusnim čepovima. Posude se protresu i stave u inkubator za uzgoj. Alge se tijekom ispitivanja moraju držati u suspenziji i mora se omogućiti prijenos CO_2. To se postiže stalnim tresenjem ili miješanjem. Kulture treba držati na temperaturi između 21 i 24 °C, uz toleranciju ± 2 °C. Kod vrsta koje nisu navedene u Dodatku 2., npr. tropskih vrsta, mogu biti primjerene više temperature, pod uvjetom da se mogu ispuniti kriteriji valjanosti. Preporučuje se da se tikvice nasumično rasporede u inkubatoru i svakodnevno razmještaju.

30. pH-vrijednost kontrolnog medija tijekom ispitivanja ne smije se povećati za više od 1,5 jedinica. Kod metala i kemikalija koji djelomično ioniziraju pri pH-vrijednosti koja je približna ispitnoj pH-vrijednosti ponekad je nužno ograničiti pomak pH-vrijednosti kako bi se dobili obnovljivi i dobro definirani rezultati. Pomak od < 0,5 pH jedinica tehnički je izvediv i može se postići osiguravanjem odgovarajućeg prijenosa mase CO_2 iz okolnog zraka u ispitnu otopinu, npr. povećanjem brzine tresenja. Druga je mogućnost da se smanji potrošnja CO_2 smanjenjem početne biomase ili trajanja ispitivanja.

31. Površina na kojoj se kulture inkubiraju mora primati neprekidno i ravnomjerno fluorescentno svjetlo, npr. hladno bijelo ili dnevno svjetlo. Različiti sojevi algi i cijanobakterija imaju različite potrebe za svjetlošću. Intenzitet svjetlosti potrebno je prilagoditi ispitnim organizmima. Intenzitet svjetlosti na razini ispitnih otopina za preporučene vrste zelenih algi treba odabrati unutar područja od 60 do 120 · μE m^{-2} s^{-1}, mjereno u fotosintetički učinkovitom spektralnom području od 400 do 700 nm primjenom odgovarajućeg prijamnika. Neke vrste, posebno *Anabena flos-aquae*, dobro rastu na svjetlosti slabijeg intenziteta i jaka ih svjetlost može oštetiti. Kod tih vrsta treba odabrati prosječni intenzitet svjetlosti u području od 40 do 60 μE m^{-2} s^{-1}. (Kod instrumenata za mjerenje intenziteta svjetlosti baždarenih u luksima područje od 4 440 do 8 880 luksa za hladno bijelo svjetlo približno odgovara preporučenom intenzitetu svjetlosti od 60 do 120 μE m^{-2} s^{-1}). Intenzitet svjetlosti treba održavati unutar ±15 % prosječnog intenziteta svjetlosti na inkubacijskom području.

▼M6

Trajanje ispitivanja

32. Ispitivanje u pravilu traje 72 sata. Ipak, ispitivanje može trajati i duže ili kraće, pod uvjetom da su zadovoljeni svi kriteriji valjanosti iz stavka 11.

Mjerenja i analitička određivanja

33. Biomasa algi u svakoj tikvici određuje se najmanje jedanput dnevno tijekom ispitivanja. Ako se mjerenja provode na malom volumenu pipetiranom iz ispitne otopine, izvađenu otopinu nije potrebno nadomjestiti.

34. Mjerenje biomase provodi se ručnim brojenjem stanica pod mikroskopom ili elektroničkim brojačem čestica (za broj stanica i/ili biovolumen). Mogu se primjenjivati i alternativne tehnike, npr. protočna citometrija, flourescencija klorofila *in vitro* ili *in vivo* (5) (6) ili optička gustoća, pod uvjetom da se može dokazati zadovoljavajuća korelacija s biomasom unutar područja biomasa koje se javljaju u ispitivanju.

35. pH-vrijednost otopina potrebno je izmjeriti na početku i na kraju ispitivanja.

36. Ako je raspoloživ analitički postupak za određivanje ispitivane kemikalije u rasponu koncentracija koje se upotrebljavaju u ispitivanju, ispitne otopine potrebno je analizirati kako bi se provjerile početne koncentracije i ujednačenost koncentracija izloženosti tijekom ispitivanja.

37. Ponekad je dovoljno analizirati koncentraciju ispitivane kemikalije u jednoj niskoj i jednoj visokoj ispitnoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja te koncentraciju oko očekivane vrijednosti EC_{50} ako se očekuje da će koncentracije izloženosti tijekom ispitivanja odstupati manje od 20 % od nazivnih vrijednosti. Ako nije vjerojatno da će koncentracije ostati unutar 80 do 120 % nazivne vrijednosti, preporučuje se analiza svih ispitnih koncentracija na početku i na kraju ispitivanja. U slučaju hlapljivih, nestabilnih i vrlo adsorptivnih ispitivanih kemikalija preporučuje se da se tijekom razdoblja izloženosti obave dodatna uzorkovanja za analizu u razmacima od 24 sata kako bi se mogao bolje odrediti gubitak ispitivane kemikalije. Kod takvih kemikalija mogu biti potrebna dodatna ponavljanja. U svakom slučaju, koncentraciju ispitivane kemikalije treba određivati samo na jednoj posudi u svakoj ispitnoj koncentraciji (ili na združenom sadržaju posuda ponavljanja).

38. S ispitnim medijima koji su posebno pripremljeni za analizu koncentracija izlaganja tijekom ispitivanja treba postupati jednako kao s medijima na kojima se provodi ispitivanje, tj. treba ih inokulirati algama i inkubirati u jednakim uvjetima. Ponekad je za analizu koncentracije otopljene ispitivane kemikalije potrebno odvojiti alge od medija. Odvajanje se po mogućnosti provodi laganim centrifugiranjem gdje je g-sila tek tolika da se postigne taloženje algi.

39. Ako je moguće dokazati da se koncentracija ispitivane kemikalije tijekom ukupnog trajanja ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako odstupanje od nazivne ili izmjerene početne koncentracije nije unutar područja od ± 20 %, analiza rezultata mora se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili modelima koji opisuju opadanje koncentracije ispitivane kemikalije (20) (8).

▼M6

40. Test inhibicije rasta algi dinamičniji je ispitni sustav nego što je to većina testova kratkotrajne toksičnosti u vodi. Stoga je ponekad teško odrediti stvarne koncentracije izlaganja, što posebno vrijedi za ispitivanja adsorptivnih kemikalija u niskim koncentracijama. U tom slučaju nestanak ispitivane kemikalije iz otopine adsorpcijom na rastuću biomasu algi ne znači gubitak kemikalije iz ispitnog sustava. Kod analize rezultata ispitivanja treba provjeriti je li smanjenje koncentracije ispitivane kemikalije tijekom ispitivanja praćeno smanjenjem inhibicija rasta. Ako je to slučaj, može se razmotriti primjena prikladnog modela koji opisuje opadanje koncentracije ispitivane kemikalije (7). U protivnom će možda biti primjereno provesti analizu rezultata na temelju početnih (nazivnih ili izmjerenih) koncentracija.

Ostala opažanja

41. Mikroskopskim pregledom trebalo bi se uvjeriti u normalan i zdrav izgled kulture inokuluma te uočiti eventualne promjene u izgledu algi (one koje mogu biti posljedica izlaganja ispitivanoj kemikaliji) na kraju ispitivanja.

Granično ispitivanje

42. U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana kemikalija nema toksično djelovanje pri koncentraciji do 100 mg/l ili do granice topljivosti u ispitnom mediju (ovisno o tomu što je manje), može se provesti granično ispitivanje za usporedbu odgovora kontrolne skupine s jednom ispitnom skupinom (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici topljivosti). Preporučuje se da se uz granično ispitivanje svakako napravi analiza koncentracije izloženosti. Za granično ispitivanje vrijede svi prethodno opisani ispitni uvjeti i kriteriji valjanosti, s time da broj ponavljanja u ispitnoj skupini ne smije biti manji od šest. Varijable odgovora u kontrolnoj i ispitnoj skupini mogu se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom. Ako su varijance dviju skupina nejednake, potrebno je provesti prilagođeni t-test za nejednake varijance.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Grafički prikaz krivulja rasta

43. Biomasa u ispitnim posudama može se izraziti u jedinicama mjerenog zamjenskog parametra (npr. broj stanica, fluorescencija).

44. Da bi se dobio grafički prikaz krivulja rasta, potrebno je izraditi tablicu procijenjenih koncentracija biomase u ispitnim i kontrolnim kulturama, zajedno s koncentracijama ispitivanog materijala, koje se bilježe s razlučljivošću od najmanje jednog cijelog sata, i vremenima mjerenja. U ovoj prvoj fazi mogu biti korisne i logaritamske i linearne skale; međutim, logaritamske su skale obvezatne i općenito daju bolji prikaz promjena uzorka rasta u razdoblju ispitivanja. Valja napomenuti da kad se eksponencijalni rast prikaže na logaritamskoj skali kao rezultat se dobiva pravac, a nagib pravca pokazuje specifičnu brzinu rasta.

45. Na grafičkim prikazima treba provjeriti rastu li kontrolne kulture tijekom ispitivanja eksponencijalno i očekivanom brzinom. Treba kritički preispitati sve točke podataka i izgled grafova te provjeriti sirove podatke i postupke kako bi se utvrdile eventualne pogreške. Potrebno je posebno provjeriti one točke podataka kod kojih se čini da su odstupanja posljedica sustavne pogreške. Ako je očito i/ili vrlo vjerojatno da je riječ o pogreškama u postupku, odgovarajuću točku treba označiti kao stršeću vrijednost i isključiti iz kasnije statističke analize. (Nulta koncentracija algi u jednoj od dvije

▼M6

ili tri posude ponavljanja može ukazivati na to da posuda nije pravilno inokulirana ili da nije bila dobro očišćena.) U izvješću o ispitivanju treba jasno navesti zašto je određena točka odbačena kao stršeća vrijednost. Prihvatljivi su razlozi samo (rijetke) pogreške u postupku, ali ne i loša preciznost. Statistički postupci za utvrđivanje stršećih vrijednosti imaju kod ove vrste problema ograničenu primjenu i ne mogu zamijeniti stručnu prosudbu. Stršeće vrijednosti (koje su označene kao takve) treba po mogućnosti zadržati među točkama podataka u kasnijim grafičkim ili tabličnim prikazima podataka.

Varijable odgovora

46. Svrha je ispitivanja utvrditi učinke ispitivane kemikalije na rast algi. U ovoj su ispitnoj metodi opisane dvije varijable odgovora, budući da različite jurisdikcije imaju različite preferencije i regulatorne zahtjeve. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim jurisdikcijama, učinke treba ocijeniti primjenom obiju varijabli odgovora opisanih u nastavku pod točkama (a) i (b).

(a) Prosječna specifična brzina rasta: ova se varijabla odgovora izračunava na temelju logaritamskog povećanja biomase u razdoblju ispitivanja, izraženog po danu

(b) Prirast: ova varijabla odgovora predstavlja biomasu na kraju ispitivanja umanjenu za početnu biomasu.

47. Valja napomenuti da vrijednosti toksičnosti izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir kod uporabe rezultata ispitivanja. Ako su ispoštovani ispitni uvjeti ove metode, vrijednosti EC_x na temelju prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) općenito su više od rezultata na temelju prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. To ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti dviju varijabli odgovora, nego jednostavno prihvatiti da su te vrijednosti matematički različite. Pojam prosječne specifične brzine rasta temelji se na općenitom obrascu eksponencijalnog rasta algi u neograničenim kulturama, gdje se toksičnost procjenjuje na temelju učinaka na brzinu rasta neovisno o apsolutnoj vrijednosti specifične brzine rasta u kontrolnoj skupini, nagibu krivulje koncentracija-odgovor i trajanju ispitivanja. Za razliku od toga, rezultati koji se temelje na varijabli odgovora „prirast" ovise o svim tim drugim varijablama. E_yC_x ovisi o specifičnoj brzini rasta vrsta algi upotrijebljenih u svakom ispitivanju i o maksimalnoj specifičnoj brzini rasta, koja se može razlikovati između vrsta, pa čak i između sojeva algi. Ovu varijablu odgovora ne treba upotrebljavati za usporedbu osjetljivosti na toksine među vrstama algi, pa čak ni među sojevima algi. Iako se, sa znanstvenog stajališta, procjeni toksičnosti na temelju prosječne specifične brzine rasta daje prednost, u ovu su ispitnu metodu uključene i procjene toksičnosti na temelju prirasta kako bi se zadovoljili trenutačni regulatorni zahtjevi u nekim državama.

Prosječna brzina rasta

48. Prosječna specifična brzina rasta u određenom razdoblju izračunava se kao logaritamsko povećanje biomase za svaku kontrolnu i ispitnu posudu primjenom sljedeće jednadžbe:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dan}^{-1}) \qquad [1],$$

gdje je:

μ_{i-j}: prosječna specifična brzina rasta od vremena *i* do vremena j;

X_i: biomasa u vremenu *i*;

X_j: biomasa u vremenu *j*

Za svaku ispitnu i kontrolnu skupinu treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta s procjenom varijance.

49. Izračuna se prosječna specifična brzina rasta za ukupno vrijeme ispitivanja (obično dana 0 – 3); pritom se umjesto izmjerene početne vrijednosti kao početna vrijednost uzima nazivna inokulirana biomasa, jer se na taj način u pravilu postiže veća preciznost. Ako oprema koja se upotrebljava za mjerenje biomase dopušta dovoljno precizno određivanje male biomase inokuluma (npr. protočni citometar), može se upotrijebiti izmjerena početna koncentracija biomase. Isto tako, treba odrediti etapnu brzinu rasta, koja se izračunava kao specifična brzina rasta za svaki dan ispitivanja (dani 0 – 1, 1 – 2 i 2 – 3), te provjeriti je li kontrolna brzina rasta stalna (vidjeti kriterije valjanosti, stavak 11.). Ako je specifična brzina rasta prvoga dana znatno niža od ukupne prosječne specifične brzine rasta, to može ukazivati na fazu prilagodbe. Dok se faza prilagodbe u kontrolnim kulturama može smanjiti i gotovo eliminirati pravilnim razmnožavanjem pretkulture, faza prilagodbe kod izloženih kultura može biti znak oporavka nakon prvobitnog toksičnog šoka ili smanjenog izlaganja zbog gubitka ispitivane kemikalije (uključujući sorpciju na biomasu algi) nakon početnog izlaganja. Stoga se može ocijeniti etapna brzina rasta kako bi se ocijenili učinci ispitivane kemikalije koji se javljaju tijekom razdoblja izlaganja. Značajne razlike između etapne brzine rasta i prosječne brzine rasta ukazuju na odstupanje od stalnog eksponencijalnog rasta i zahtijevaju temeljito preispitivanje krivulja rasta.

50. Postotak inhibicije brzine rasta za pojedina ponavljanja u ispitnim skupinama izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

gdje je:

$\%I_r$ = postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta;

μ_C = srednja vrijednost prosječne specifične brzine rasta (μ) u kontrolnoj skupini;

μ_T = prosječna specifična brzina rasta ponavljanja u ispitnoj skupini.

51. Ako se za pripremu ispitnih otopina upotrebljavaju otapala, za izračun postotka inhibicije treba upotrebljavati kontrole s otapalom, a ne bez otapala.

Prirast

52. Prirast se izračunava kao biomasa na kraju ispitivanja umanjena za početnu biomasu za svaku kontrolnu i ispitnu posudu. Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prirasta s procjenama varijance. Postotak inhibicije prirasta (% I_y) za pojedina ponavljanja u ispitnoj skupini može se izračunati na sljedeći način:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

gdje je:

% I_y = postotak inhibicije prirasta;

Y_C = srednja vrijednost prirasta u kontrolnoj skupini;

Y_T = vrijednost prirasta ponavljanja u ispitnoj skupini.

Grafički prikaz krivulje koncentracija-odgovor

53. Napravi se grafički prikaz postotka inhibicije u odnosu na logaritam koncentracije ispitivane kemikalije i dobiveni se graf detaljno pregleda, zanemarujući sve točke podataka koje su u prvoj fazi izdvojene kao stršeće vrijednosti. Točkama podataka prostim okom ili računalnom interpolacijom prilagodi se glatka krivulja kako bi se dobio prvi dojam o odnosu koncentracija-odgovor te se potom nastavlja detaljnijom metodom, po mogućnosti računalnom statističkom metodom. Ovisno o predviđenoj uporabi podataka, kvaliteti (preciznosti) i količini podataka te raspoloživosti alata za analizu podataka, može se donijeti odluka (koja je u određenim slučajevima posve opravdana) da se u ovoj fazi prekine analiza podataka i jednostavno očitaju ključne vrijednosti EC_{50} i EC_{10} (i/ili EC_{20}) s krivulje podešene prostim okom (vidjeti i odjeljak u nastavku o stimulirajućim učincima). Neki su od valjanih razloga za neupotrebu statističke metode:

— s obzirom na raspoložive podatke, računalnim se metodama ne mogu dobiti pouzdaniji rezultati od onih koji se mogu dobiti stručnom prosudbom – može se dogoditi da neki računalni programi uopće ne daju nikakvo pouzdano rješenje (iteracije ne konvergiraju itd.),

— raspoloživi računalni programi nisu prikladni za obradu učinaka stimulacije rasta (vidjeti u nastavku).

Statistički postupci

54. Cilj je dobiti kvantitativni odnos koncentracija-odgovor regresijskom analizom. Ako se provede linearizacijska pretvorba podataka odgovora – npr. u jedinice probit, logit ili Weibullova modela (8) – može se provesti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije koji se bolje nose s neizbježnim nepravilnostima podataka i odstupanjima od pravilnih razdioba. S približavanjem nultoj ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti mogu pretvorbom i dodatno povećati te tako otežati analizu (8). Valja napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti dobivene pretvorbom (probit, logit ili Weibull) namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i moraju se prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o rastu ili biomasi. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi pod (9) (10) i (11). Primjena nelinearne regresijske analize podrobnije je opisana u Dodatku 5.

55. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira potrebno je izračunati procjene točaka za vrijednosti EC_x na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Po mogućnosti, za sve procjene treba odrediti granice pouzdanosti 95 %. Valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom procjenjuje se grafički ili statistički. Regresijsku analizu potrebno je provesti na temelju pojedinačnih odgovora u ponavljanjima, a ne na temelju srednjih vrijednosti ispitnih skupina. Ipak, ako je nelinearno prilagođavanje krivulje

▼M6

teško ili nemoguće zbog velike raspršenosti podataka, problem se može zaobići provođenjem regresije na srednjim vrijednostima po skupinama kao praktičnim načinom smanjenja utjecaja mogućih stršećih vrijednosti. Ako se primjenjuje ova opcija, to treba navesti u izvješću o ispitivanju kao odstupanje od uobičajenog postupka uz napomenu da prilagođavanje krivulje pojedinačnim ponavljanjima nije dalo dobar rezultat.

56. Ako raspoloživi regresijski modeli/metode nisu prikladni za podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”) (13).

57. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, u vezi s učincima ispitivane kemikalije na brzinu rasta potrebno je usporediti srednje vrijednosti obrada primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti s kontrolnom srednjom vrijednošću primjenom odgovarajuće metode višestruke usporedbe ili testa trenda. Ovdje može biti koristan Dunnettov ili Williamsov test (12) (14) (15) (16) (17). Potrebno je provjeriti vrijedi li pretpostavka homogenosti varijanci ANOVA-e. To se može učiniti grafički ili formalnim testom (17). Prikladni su Leveneov i Bartlettov test. Ako pretpostavka homogenosti varijanci nije zadovoljena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom pretvorbom podataka. Ako je heterogenost varijance prevelika da bi se mogla ispraviti pretvorbom, trebalo bi razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonckheereovi testovi trenda postupnim snižavanjem. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (11).

58. Novije znanstvene spoznaje rezultirale su preporukom da se pojam NOEC-a napusti i zamijeni procjenama točaka EC_x dobivenih regresijom. Za ovaj test s algama nije utvrđena određena vrijednost x. Čini se da je primjereno područje od 10 do 20 % (ovisno o odabranoj varijabli odgovora), a poželjno je da se navedu obje vrijednosti, EC_{10} i EC_{20}.

Stimulacija rasta

59. Ponekad se pri niskim koncentracijama može zapaziti stimulacija rasta (negativna inhibicija). To može biti posljedica hormeze (toksička stimulacija) ili unošenja stimulirajućih faktora rasta s ispitivanim materijalom u upotrijebljeni minimalni medij. Dodavanje anorganskih nutrijenata ne bi smjelo imati nikakav izravan utjecaj budući da ispitni medij tijekom ispitivanja mora stalno sadržavati višak nutrijenata. Stimulacija pri niskim dozama u pravilu se može zanemariti kod izračunavanja EC_{50}, osim ako je ekstremno visoka. U slučaju ekstremne stimulacije, ili kad je potrebno izračunati EC_x za niske vrijednosti x, ponekad je potrebno primijeniti posebne postupke. Pojave stimulacije rasta potrebno je kad je god to moguće uključiti u analizu podataka, a ako raspoloživi softver za prilagođavanje krivulje ne može prihvatiti male vrijednosti stimulacije, može se primijeniti linearna interpolacija sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”). U slučaju ekstremne stimulacije može se razmotriti primjena modela hormeze (18).

Netoksična inhibicija rasta

60. Ispitivani materijali koji apsorbiraju svjetlost mogu izazvati smanjenje brzine rasta stvaranjem sjene, koja smanjuje raspoloživu količinu svjetlosti. Ove i druge slične fizikalne učinke treba odvojiti od toksičnih učinaka izmjenom ispitnih uvjeta i treba ih posebno navesti u izvješću o ispitivanju. Smjernice se mogu pronaći u literaturi pod (2) i (3).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće:

▼**M6**

Ispitivana kemikalija:

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva, uključujući granicu topljivosti u vodi,

— podaci za identifikaciju kemikalije (npr. CAS broj), uključujući čistoću (nečistoće).

Ispitne vrste:

— soj, dobavljač odnosno izvor i primijenjeni uvjeti uzgoja.

Uvjeti ispitivanja:

— datum početka ispitivanja i trajanje,

— plan ispitivanja: ispitne posude, volumeni kulture, gustoća biomase na početku ispitivanja,

— sastav medija,

— ispitne koncentracije i ponavljanja (npr. broj ponavljanja, broj ispitnih koncentracija i primijenjena geometrijska progresija),

— opis pripreme ispitnih otopina, uključujući primjenu otapala itd.,

— inkubator za uzgoj:

— intenzitet i kvaliteta svjetlosti (izvor, homogenost),

— temperatura,

— ispitane koncentracije: nazivne ispitne koncentracije i rezultati analiza za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama; potrebno je navesti iskorištenje metode i granicu kvantifikacije u ispitnom matriksu,

— sva odstupanja od ove ispitne metode,

— metoda određivanja biomase i dokaz korelacije između izmjerenog parametra i suhe mase.

Rezultati:

— pH-vrijednosti na početku i kraju ispitivanja u svim obradama,

— biomasa za svaku tikvicu u svakoj mjernoj točki i metoda mjerenja biomase,

— krivulje rasta (grafički prikaz biomase u ovisnosti o vremenu),

— izračunane varijable odgovora za svako ponavljanje u ispitnim skupinama, uključujući srednje vrijednosti i koeficijent varijacije ponavljanja,

— grafički prikaz odnosa koncentracije i učinka,

▼M6

— procjene toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} i odgovarajući intervali pouzdanosti; ako se izračunavaju, LOEC i NOEC te statističke metode koje su upotrijebljene za njihovo određivanje,

— Ako je upotrijebljena ANOVA, veličina učinka koja se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— eventualna stimulacija rasta u bilo kojoj obradi,

— svi ostali zapaženi učinci, npr. morfološke promjene algi,

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na ishod ispitivanja koji proizlazi iz odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

(1) International Organisation for Standardisation (1993.) ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (1998.) ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000.) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, br. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998.) ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. i Nyholm, N. (1997.) A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525 – 2531.

(6) Slovacey, R. E. i Hanna, P. J. (1997.) In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L. i Batley, G. E. (2003.) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073 – 2079.

(8) Christensen, E. R., Nyholm, N. (1984.) Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713 – 718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P. S., Kusk, K. O. i Christensen, E. R. (1992.) Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157 – 167.

(10) Bruce, R. D. i Versteeg, D. J. (1992.) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485 – 1494.

(11) OECD (2006.) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C. W. (1955.) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King, T. J. (1988.) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C. W. (1964.) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482 – 491.

(15) Williams, D. A. (1971.) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103 – 117.

(16) Williams, D. A. (1972.) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519 – 531.

(17) Draper, N. R. i Smith, H. (1981.) Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. i Cousens, R. (1989.) An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93 – 96.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije i kratice:

Biomasa je suha masa žive tvari u populaciji izražena u odnosu na dani volumen; npr. mg algi / l l ispitne tekućine. „Biomasa" se obično definira kao masa, ali se u ovom testu ta riječ odnosi na masu po volumenu. Osim toga, u ovom se testu u pravilu mjere i zamjenski parametri biomase kao što su broj stanica, fluorescencija itd. pa se izraz „biomasa" odnosi i na te zamjenske mjere.

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Koeficijent varijacije je bezdimenzionalna mjera varijabilnosti parametra, definirana kao omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti. Može se izraziti i kao postotak. Srednji koeficijent varijacije prosječne specifične brzine rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura izračunava se na sljedeći način:

1. Izračuna se postotak koeficijenta varijacije (KV) prosječne specifične brzine rasta iz dnevnih/etapnih brzina rasta za odgovarajuće ponavljanje.

2. Izračuna se srednja vrijednost svih izračunanih vrijednosti iz točke 1. kako bi se dobio srednji koeficijent varijacije dnevne/etapne specifične brzine rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura.

EC_x je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja rezultira x-postotnim (npr. 50 %) smanjenjem rasta ispitnog organizma unutar navedenoga razdoblja izlaganja (koje je potrebno izričito navesti ako odstupa od punog ili uobičajenog trajanja ispitivanja). Da bi se nedvosmisleno pokazalo je li vrijednost EC dobivena iz brzine rasta ili iz prirasta, za brzinu rasta upotrebljava se simbol „E_rC", a za prirast simbol „E_yC".

Uzgojni medij je kompletna sintetička hranjiva podloga u kojoj ispitne alge rastu kad se izlože ispitivanoj tvari. Ispitivana se kemikalija obično otapa u ispitnom mediju.

Brzina rasta (prosječna specifična brzina rasta) je logaritamsko povećanje biomase tijekom razdoblja izlaganja.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*, LOEC) najniža je ispitana koncentracija kod koje je uočeno da kemikalija ima statistički značajan usporavajući učinak na rast (pri $p < 0{,}05$) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a moraju imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je zabilježen pri LOEC-u. Ako se ova dva uvjeta ne mogu zadovoljiti, potrebno je detaljno objasniti kako je odabran LOEC (a prema tomu i NOEC).

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (engl. *No Observed Effect Concentration*, NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo kojeg izmjerenog parametra koji opisuje biomasu primjenom različitih računskih metoda. Kod ove su ispitne metode stope rasta i prirast varijable odgovora dobivene izravnim mjerenjem biomase ili bilo kojeg navedenog zamjenskog parametra.

▼**M6**

Specifična brzina rasta je varijabla odgovora definirana kao kvocijent razlike prirodnih logaritama promatranog parametra (kod ove je ispitne metode to biomasa) i odgovarajućeg vremenskog razdoblja.

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

Prirast je vrijednost mjerne varijable na kraju razdoblja izlaganja umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja, kojom se izražava povećanje biomase tijekom ispitivanja.

▼M6

Dodatak 2.

Sojevi koji su se pokazali prikladnima za ispitivanje

Zelene alge

Pseudokirchneriella subcapitata (ranije poznata kao *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (ranije poznata kao *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Dijatomeje

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cijanobakterije

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Izvori sojeva

Preporučeni sojevi raspoloživi su u kulturama jedne vrste algi iz sljedećih zbirki (abecednim redom):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
SAD

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
3703 Göttingen
NJEMAČKA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
SAD

▼M6

Izgled i svojstva preporučenih vrsta

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Izgled	Zakrivljene, uvijene pojedinačne stanice	Duguljaste, većinom pojedinačne stanice	Štapićaste	Lanci duguljastih stanica	Štapićaste
Veličina (D × Š) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volumen stanica (μm^3/stanica)	40 – 60 (1)	60 – 80 (1)	40 – 50 (1)	30 – 40 (1)	2,5 (2)
Suha masa stanica (mg/stanica)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Brzina rasta (3) (dan^{-1})	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 × 2,4

(1) Mjereno elektroničkim brojačem čestica
(2) Izračunano iz veličine
(3) Najčešće zapažena brzina rasta u mediju OECD pri intenzitetu svjetlosti od oko 70 µE m^{-2} s^{-1} i temperaturi od 21 °C

Posebne preporuke za uzgoj i rukovanje preporučenim ispitnim vrstama

Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus

Ove je zelene alge općenito lako održavati u različitim medijima kulture. Informacije o prikladnim medijima mogu se dobiti u zbirkama kultura. U pravilu je riječ o pojedinačnim stanicama i mjerenja gustoće stanica mogu se jednostavno obaviti s pomoću elektroničkog brojača čestica ili mikroskopa.

Anabaena flos-aquae

Za držanje radne kulture mogu se upotrebljavati različiti uzgojni mediji. Osobito je važno ne dopustiti da šaržna kultura kod obnavljanja ne prođe logaritamsku fazu rasta, jer je tada regeneracija teška.

Anabaena flos-aquae tvori nakupine isprepletenih lanaca stanica. Veličina nakupina može biti različita, ovisno o uzgojnim uvjetima. Te je nakupine ponekad potrebno razbiti ako se biomasa određuje brojenjem pod mikroskopom ili elektroničkim brojačem čestica.

Da bi se smanjila varijabilnost rezultata brojenja, lanci se mogu razbiti ultrazvučnom obradom poduzoraka. Ultrazvučna obrada ne smije trajati duže nego što je potrebno da se lanci razbiju na kraće lance, jer se u protivnom stanice mogu uništiti. Intenzitet i trajanje ultrazvučne obrade moraju biti jednaki kod svih uzoraka.

Na hemocitometru treba izbrojiti dovoljan broj polja (najmanje 400 stanica) da bi se mogla ispraviti odstupanja. Time se poboljšava pouzdanost mikroskopskih određivanja gustoće.

Nakon što se lanci stanica razbiju pažljivom ultrazvučnom obradom, za određivanje ukupnog volumena stanica *Anabaena* može se upotrijebiti elektronički brojač čestica. Ultrazvučnu energiju potrebno je prilagoditi tako da se izbjegne oštećenje stanica.

Da bi se dobila dobro izmiješana i homogena suspenzija algi za inokulaciju ispitnih posuda, potrebno je upotrijebiti vortex miješalicu ili sličnu prikladnu metodu.

▼M6

Ispitne posude potrebno je staviti na orbitalnu ili linearnu tresilicu na oko 150 okretaja u minuti. Drugi je način da se smanji tendencija tvorbe gruda kod *Anabaena* periodično mućkanje. Kod pojave gruda treba paziti da se za mjerenje biomase dobiju reprezentativni uzorci. Ponekad je prije uzorkovanja potrebno snažno protresti posude da bi se razbile grude algi.

Synechococcus leopoliensis

Za držanje radne kulture mogu se upotrebljavati različiti uzgojni mediji. Informacije o prikladnim medijima mogu se dobiti u zbirkama kultura.

Synechococcus leopoliensis raste u obliku pojedinačnih štapićastih stanica. Stanice su vrlo malene, što otežava mjerenje biomase brojenjem pod mikroskopom. Ovdje mogu pomoći elektronički brojači čestica opremljeni za brojenje čestica do veličine od oko 1 μm. Osim toga, mogu se primijeniti i fluorometrijska mjerenja *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Za držanje radne kulture mogu se upotrebljavati različiti uzgojni mediji. Informacije o prikladnim medijima mogu se dobiti u zbirkama kultura. Medij mora sadržavati silikat.

Navicula pelliculosa može u određenim uvjetima rasta stvarati nakupine. Stanice algi ponekad se nakupljaju u površinskoj emulziji zbog tvorbe lipida. U tom se slučaju kod uzimanja poduzoraka za određivanje biomase moraju poduzeti posebne mjere kako bi se dobili reprezentativni uzorci. Ponekad je nužno i snažno protresanje, npr. uz pomoć vortex miješalice.

▼**M6**

Dodatak 3.

Uzgojni mediji

Može se upotrijebiti jedan od sljedećih dvaju uzgojnih medija:

— Medij OECD: izvorni medij OECD TG 201, također u skladu s normom ISO 8692,

— US. EPA medij AAP, također u skladu s normom ASTM.

Kod pripreme tih medija potrebno je upotrijebiti reagencijski ili analitički čiste kemikalije i deioniziranu vodu.

Sastav medija AAP (US. EPA) i medija OECD TG 201

Sastojak	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2$ $2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Molarni omjer EDTA – željezo nešto je veći od jedan. Time se sprječava taloženje željeza i istovremeno smanjuje kelatiranje iona teških metala.

Kod ispitivanja s dijatomejom *Navicula pelliculosa* oba medija treba nadopuniti s $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ tako da se dobije koncentracija od 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

pH-vrijednost medija određuje se kad se uspostavi ravnoteža između karbonatnog sustava medija i parcijalnog tlaka CO_2 u atmosferskom zraku. Približni odnos između pH na 25 °C i molarne koncentracije bikarbonata proizlazi iz sljedeće formule:

$pH_{eq} = 11.30 + \log[HCO_3]$

S 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (medij US EPA), a s 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (medij OECD).

Udjeli elemenata u ispitnim medijima

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Priprema medija OECD

Nutrijent	Koncentracija u radnoj otopini
Radna otopina 1: makronutrijenti	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Radna otopina 2: željezo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Radna otopina 3: elementi u tragovima	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutrijent	Koncentracija u radnoj otopini
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Radna otopina 4: bikarbonat $NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	50 g/l

Radne se otopine steriliziraju membranskom filtracijom (srednji promjer pora 0,2 μm) ili obradom u autoklavu (120 °C, 15 min). Otopine se pohrane u mraku na temperaturi od 4 °C.

Radne otopine 2 i 4 ne steriliziraju se u autoklavu, nego membranskom filtracijom.

Uzgojni medij priprema se dodavanjem odgovarajućeg volumena radnih otopina 1 do 4 u vodu.

U 500 ml sterilizirane vode doda se:

10 ml radne otopine 1

1 ml radne otopine 2

1 ml radne otopine 3

1 ml radne otopine 4

Nadopuni se steriliziranom vodom do 1 000 ml.

Zatim treba ostaviti dovoljno vremena za uspostavu ravnoteže između medija i atmosferskog CO_2, prema potrebi upuhivanjem sterilnog filtriranog zraka u trajanju od nekoliko sati.

Priprema medija US EPA

1. U približno 900 ml deionizirane ili destilirane vode doda se po 1 ml radnih otopina *2.1. – 2.7.* i razrijedi do jedne litre.

2. Radne otopine s makronutrijentima pripreme se otapanjem sljedećih količina tvari u 500 ml deionizirane ili destilirane vode. Reagensi *2.1., 2.2., 2.3.* i *2.4.* mogu se združiti u jednu radnu otopinu.

2.1. $NaNO_3$ 12,750 g;

2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6,082 g;

2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2,205 g;

2.4. Radna otopina s mikronutrijentima (vidjeti 3);

2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 7,350 g;

2.6. K_2HPO_4 0,522 g;

2.7. $NaHCO_3$ 7,500 g;

2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ vidjeti napomenu 1.

▼**M6**

Napomena 1.: Upotrijebiti samo kod ispitivanja s dijatomejama. Može se dodati izravno (202,4 mg) ili putem radne otopine tako da se dobije konačna koncentracija 20 mg/l Si u mediju.

3. Radna otopina s mikronutrijentima priprema se otapanjem sljedećih količina tvari u 500 ml deionizirane ili destilirane vode:

3.1.	H_3BO_3	92,760 mg;
3.2.	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg;
3.3.	$ZnCl_2$	1,635 mg;
3.4.	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg;
3.5.	CoCl2·6H2O	0,714 mg;
3.6.	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg;
3.7.	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg;
3.8.	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg [dinatrijev (etilendinitrilo) tetraacetat];
3.9.	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg (vidjeti napomenu 2.).

Napomena 2.: Upotrijebiti samo u mediju za radne kulture s dijatomejama.

4. Prilagoditi pH-vrijednost na 7,5 ± 0,1 s pomoću 0,1 *N* ili 1,0 *N* NaOH ili HCl.

5. Medij se profiltrira u sterilnu posudu kroz membranski filtar od 0,22 μm ako će se upotrijebiti brojač čestica ili kroz membranski filtar od 0,45 μm ako se neće upotrijebiti brojač čestica.

6. Medij je do uporabe potrebno pohraniti u mraku na temperaturi od približno 4 °C.

▼M6

Dodatak 4.

Primjer postupka za uzgoj kulture algi

Opće napomene

Uzgoj kultura u skladu s ovim postupkom provodi se radi dobivanja kultura algi za toksikološka ispitivanja.

Potrebno je primijeniti prikladne metode kako bi se osiguralo da kulture algi ne budu inficirane bakterijama. Iako aksenične kulture mogu biti poželjne, svakako se moraju uspostaviti i upotrijebiti kulture koje sadržavaju samo jednu vrstu algi.

Sve postupke treba provoditi u sterilnim uvjetima kako bi se izbjeglo onečišćenje bakterijama i drugim algama.

Oprema i materijali

Vidjeti: Ispitna metoda: Aparatura.

Postupci za dobivanje kultura algi

Priprema hranjivih otopina (medija):

Sve se hranjive soli medija pripremaju kao koncentrirane radne otopine i čuvaju na tamnom i hladnom mjestu. Otopine se steriliziraju filtracijom ili obradom u autoklavu.

Medij se priprema dodavanjem ispravne količine radne otopine u sterilnu destiliranu vodu, pazeći da ne dođe do infekcije. Kod krutih medija treba dodati 0,8 % agara.

Radna kultura:

Radne kulture su male kulture algi koje se redovito prenose u svježi medij i upotrebljavaju kao polazni ispitni materijal. Ako se kulture ne upotrebljavaju redovito, nanose se na kosi agar u epruvetama. Kulture se prenose u svježi medij najmanje jedanput u dva mjeseca.

Radne se kulture uzgajaju u stožastim tikvicama koje sadržavaju odgovarajući medij (oko 100 ml). Kad se alge inkubiraju na 20 °C uz neprekidno osvjetljenje, potrebno je tjedno prenošenje.

Kod prenošenja se određena količina „stare” kulture prenese sterilnim pipetama u tikvicu sa svježim medijem tako da kod brzorastućih vrsta početna koncentracija bude oko 100 puta niža nego u staroj kulturi.

Brzina rasta vrste može se odrediti iz krivulje rasta. Ako je ona poznata, moguće je procijeniti gustoću pri kojoj je kulturu potrebno prenijeti u novi medij. To se mora učiniti prije nego što kultura dosegne fazu odumiranja.

Pretkultura:

Pretkultura je namijenjena dobivanju količine algi primjerene za inokulaciju ispitnih kultura. Pretkultura se inkubira u uvjetima ispitivanja i upotrebljava se dok još eksponencijalno raste, obično nakon razdoblja inkubacije od dva do četiri dana. Kulture algi koje sadržavaju deformirane ili abnormalne stanice potrebno je odbaciti.

▼M6

Dodatak 5.

Analiza podataka nelinearnom regresijom

Opća razmatranja

Kod testova s algama i drugih testova mikrobnog rasta – rasta biomase – odgovor je po svojoj prirodi kontinuirana ili metrička varijabla – brzina procesa, ako se upotrebljava brzina rasta, i njezin vremenski integral, ako je odabrana biomasa. Oba se parametra stavljaju u odnos prema odgovarajućem srednjem odgovoru ponavljanja neizloženih kontrola koje najjače reagiraju na dane uvjete; u testu s algama glavni su čimbenici svjetlost i temperatura. Sustav je podijeljen ili homogen, a biomasa se može promatrati kao kontinuum bez razmatranja pojedinačnih stanica. Razdioba varijance za odgovore kakvi se javljaju kod ovakvih sustava ovisi isključivo o pokusnim čimbenicima (koji se obično opisuju putem lognormalnih ili normalnih razdioba pogreške). To je u suprotnosti s tipičnim odgovorima kod biopokusa s kvantalnim podacima, gdje se tolerancija (u pravilu s binomnom razdiobom) pojedinačnih organizama često smatra dominantnom komponentom varijance. Ovdje su odgovori kontrola nula ili na razini osnovne vrijednosti.

U najjednostavnijem slučaju normirani odnosno relativni odgovor r jednoliko opada od 1 (nulta inhibicija) do 0 (stopostotna inhibicija). Valja napomenuti da su svi odgovori povezani s pogreškom te da se očite negativne inhibicije mogu izračunati samo kao rezultat slučajne pogreške.

Regresijska analiza

Modeli

Cilj je regresijske analize kvantitativno opisati krivulju koncentracija-odgovor u obliku matematičke regresijske funkcije $Y = f(C)$ ili češće $F(Z)$, gdje je $Z = \log C$. Inverzna funkcija $C = f^{-1}(Y)$ omogućuje izračunavanje vrijednosti EC_x, uključujući EC_{50}, EC_{10} i EC_{20} te njihovih granica pouzdanosti od 95 %. Pokazalo se da nekoliko jednostavnih matematičkih funkcija uspješno opisuju odnose koncentracija-odgovor koji se dobivaju u testovima inhibicije rasta algi. Te funkcije obuhvaćaju npr. logističku jednadžbu, nesimetričnu Weibullovu jednadžbu i funkciju lognormalne razdiobe, koje sve predstavljaju sigmoidne krivulje koje se asimptotski približavaju nuli kod $C \rightarrow 0$ i vrijednosti 1 kod $C \rightarrow$ beskonačno.

Primjena modela neprekinute funkcije s pragom (npr. Kooijmanov model „inhibicije rasta populacije” (Kooijman i sur., 1996.) u zadnje se vrijeme predlaže kao alternativa asimptotskim modelima. Ovaj model polazi od pretpostavke da nema nikakvih učinaka pri koncentracijama ispod određenoga praga EC_0+ koji se procjenjuje ekstrapolacijom odnosa koncentracija-odgovor sa sjecištem u osi koncentracije primjenom jednostavne neprekinute funkcije koja nije diferencijabilna u polaznoj točki.

Valja napomenuti da se analiza može provesti jednostavnim minimiziranjem zbrojeva rezidualnih kvadrata (uz pretpostavku stalne varijance) ili ponderiranih kvadrata, ako se ispravlja heterogenost varijance.

Postupak

Postupak se može ukratko opisati na način opisan u nastavku. Odabere se odgovarajuća funkcijska jednadžba, $Y = f(C)$, i prilagodi podacima nelinearnom regresijom. Poželjno je da se umjesto srednjih vrijednosti ponavljanja upotrebljavaju mjerenja pojedinačnih tikvica kako bi se iz podataka izvuklo što je moguće više informacija. Međutim, ako je varijanca visoka, praktična iskustva

▼M6

pokazuju da srednje vrijednosti ponavljanja mogu dati pouzdaniju matematičku procjenu uz manji utjecaj sustavnih pogrešaka podataka nego što je to slučaj kad se zadrže pojedinačne točke podataka.

Napravi se grafički prikaz prilagođene krivulje i izmjerenih podataka te se provjeri je li krivulja ispravno prilagođena. Ovdje se posebno korisnom može pokazati analiza reziduala. Ako funkcionalni odnos koji je odabran za prilagođavanje krivulje koncentracija-odgovor dobro ne opisuje čitavu krivulju ili neki njezin bitan dio, npr. odgovor pri niskoj koncentraciji, za prilagođavanje krivulje treba odabrati neku drugu opciju – npr. nesimetričnu krivulju Weibullove funkcije umjesto simetrične. Negativne inhibicije mogu predstavljati problem npr. kod funkcije lognormalne razdiobe te zahtijevati da se upotrijebi i alternativna regresijska funkcija. Nije preporučljivo da se tim negativnim vrijednostima dodijeli vrijednost nula ili mala pozitivna vrijednost jer se time iskrivljuje razdioba pogrešaka. Ponekad je primjereno napraviti zasebno prilagođavanje određenih dijelova krivulje, npr. dijela krivulje s niskom inhibicijom, kako bi se dobila procjena vrijednosti EC_{lowx}. Iz prilagođene jednadžbe izračunaju se („inverznom procjenom" $C = f^{-1}(Y)$), karakteristične procjene točaka EC_x i dokumentira barem EC_{50} i jedna ili dvije procjene $EC_{low\ x}$. Iskustva s praktičnim ispitivanjima pokazuju da je test s algama dovoljno precizan da se u pravilu može dobiti dovoljno točna procjena kod inhibicije od 10 % pod uvjetom da su točke podataka dostatne – osim ako se pri niskim koncentracijama javlja stimulacija rasta kao zbunjujući faktor. Preciznost procjene EC_{20} često je znatno veća od EC_{10} jer je EC_{20} obično smješten u približno linearnom dijelu središnje krivulje koncentracija-odgovor. Ponekad se EC_{10} teško tumači zbog stimulacije rasta. Prema tomu, iako se EC_{10} u pravilu može dobiti s dovoljnom točnošću, preporučuje se da se uz njega uvijek navede i EC_{20}.

Ponderi

Varijanca pokusa općenito nije stalna i obično uključuje proporcionalnu komponentu te je stoga uvijek dobro rutinski provesti ponderiranu regresiju. Kod takve analize obično se uzima da su ponderi obrnuto proporcionalni varijanci:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Brojni regresijski programi nude mogućnost ponderirane regresijske analize primjenom pondera koji su navedeni u tablici. Ponderi se radi jednostavnosti normiraju množenjem s $n/\Sigma\ w_i$ (n je broj točaka podataka) tako da njihov zbroj bude 1.

Normalizacija odgovora

Normalizacijom s pomoću srednjeg odgovora kontrola javljaju se neki temeljni problemi i dobiva se prilično komplicirana struktura varijance. Dijeljenjem odgovora sa srednjim odgovorom kontrola da bi se dobio postotak inhibicije uvodi se dodatna pogreška koja proizlazi iz pogreške srednje kontrolne vrijednosti. Osim kad je ta pogreška zanemarivo mala, ponderi regresije i granice pouzdanosti moraju se ispraviti za kovarijancu s kontrolom (Draper i Smith, 1981). Valja napomenuti da je važno postići visoku preciznost procjene srednje vrijednosti kontrolnih odgovora kako bi se smanjila ukupna varijanca relativnog odgovora. Ta se varijanca može opisati ovako:

(indeks i odnosi se na razinu koncentracije i, a indeks 0 na kontrole)

$$Yi = \text{relativni odgovor} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

s varijancom $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

i budući da je $(\partial\ Y_i/ \partial\ r_i) = 1/r_0$ i $(\partial\ Y_i/ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

uz normalnu razdiobu podataka i ponavljanja m_i i m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

ukupna varijanca relativnog odgovora Y_i prema tomu postaje:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Pogreška srednje kontrolne vrijednosti obrnuto je proporcionalna kvadratnom korijenu broja prosječnih kontrolnih ponavljanja i stoga je ponekad opravdano uključiti podatke iz ranijih ispitivanja, čime se može znatno smanjiti pogreška. Druga je mogućnost da se umjesto normalizacije podataka i prilagođavanja apsolutnih odgovora, uključujući podatke o kontrolnim odgovorima, kontrolni odgovor uvede kao dodatni parametar koji se prilagođava linearnom regresijom. Ova metoda uz uobičajenu regresijsku jednadžbu s dva parametra zahtijeva prilagođavanje triju parametara, tako da je potrebno više točaka podataka nego što je to slučaj kod nelinearne regresije podataka normaliziranih uporabom unaprijed definiranog kontrolnog odgovora.

Obrnuti intervali pouzdanosti

Izračunavanje intervala pouzdanosti nelinearne regresije inverznom procjenom prilično je složeno i ne predstavlja standardnu opciju u uobičajenim statističkim računalnim programskim paketima. Približne granice pouzdanosti mogu se dobiti standardnim programima nelinearne regresije s reparametrizacijom (Bruce i Versteeg, 1992.), pri čemu se matematička jednadžba mora preraditi tako da se na mjesto parametara za procjenu uvrste željene procjene točaka, npr. EC_{10} i EC_{50}. (Ako je funkcija I = f (α, β, koncentracija), f (α, β, koncentracija) zamijeni se istovjetnom funkcijom g (EC_{10}, EC_{50}, koncentracija) uporabom definicijskih odnosa f (α, β, EC_{10}) = 0,1 i f (α, β, EC_{50}) = 0,5.)

Izravniji izračun (Andersen i sur., 1998.) dobije se ako se zadrži izvorna jednadžba i upotrijebi Taylorov razvoj oko srednjih vrijednosti r_i i r_0.

U posljednje su vrijeme postale popularne metode samonadopunjavanja („boot strap” metode). Te metode uključuju procjenu empirijske razdiobe varijance na temelju izmjerenih podataka i učestalog uzorkovanja primjenom generatora slučajnih brojeva.

IZVORI

Kooijman, S. A. L. M.; Hanstveit, A. O.; Nyholm, N. (1996.): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625 – 1632.

Draper, N. R. i Smith, H. (1981.). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R. D. i Versteeg, D. J. (1992.) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem*.11, 1485 – 1494.

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. i Nyholm, N. (1998.) Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405 – 420.

▼B

C.4. **ODREĐIVANJE „LAKE" BIORAZGRADIVOSTI**

I. DIO **OPĆENITO**

I.1. UVOD

Opisano je šest ispitnih metoda koje omogućuju pretraživanje kemikalija na laku biorazgradivost u aerobnom vodenom mediju:

(a) test opadanja otopljenog organskog ugljika (DOC) (metoda C.4.-A);

(b) izmijenjeni test pretraživanja OECD – opadanje DOC-a (metoda C.4.-B);

(c) test razvijanja ugljikovog dioksida (CO_2) (izmijenjeni Sturmov test) (metoda C.4.-C);

(d) manometrijsko-respirometrijski test (metoda C.4.-D);

(e) test sa zatvorenim bocama (metoda C.4.-E);

(f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japan) (metoda C.4.-F)

U dijelu I. metode nalaze se opće napomene za svih šest testova. Specifičnosti pojedinih metoda navedene su u dijelovima od II. do VII. Dodaci sadrže definicije, formule i smjernice.

Međulaboratorijsko poredbeno ispitivanje OECD-a iz 1988. pokazalo je da metode daju dosljedne rezultate. Ipak, određenoj se metodi može dati prednost ovisno o fizikalnim svojstvima tvari koja se ispituje.

I.2. ODABIR ODGOVARAJUĆE METODE

Informacije o topljivosti kemikalije, tlaku pare i adsorpcijskim svojstvima ključne su za odabir najprikladnije metode. Za izračunavanje teoretskih vrijednosti i/ili provjeru izmjerenih vrijednosti parametara npr. TPK, $ThCO_2$, DOC, TOC, KPK treba biti poznata kemijska struktura ili formula (vidjeti dodatke 1. i 2.).

Ispitivane kemikalije koje su topljive u vodi do najmanje 100 mg/l mogu se ocijeniti svim metodama pod uvjetom da nisu hlapljive i nisu adsorptivne. Prikladne metode za kemikalije koje su slabo topljive u vodi, hlapljive ili adsorptivne navedene su u tablici 1. Postupanje s kemikalijama koje su slabo topljive u vodi i hlapljivim kemikalijama opisan je u Dodatku 3. Umjereno hlapljive kemikalije mogu se ispitivati metodom opadanja DOC-a ako u ispitnim posudama (koje moraju biti dobro začepljene) ima dovoljno plinskog prostora. U tom slučaju treba predvidjeti abiotičku kontrolu da bi se mogli uzeti u obzir mogući fizički gubici.

▼B

Tablica 1.:

Primjenljivost ispitnih metoda

Test	Analitička metoda	Prikladnost za tvari koje su:		
		slabo topljive	hlapljive	adsorptivne
Test opadanja DOC-a	Otopljeni organski ugljik	—	—	+/–
Izmijenjeni test pretraživanja OECD	Otopljeni organski ugljik	—	—	+/–
Test razvijanja CO_2	Respirometrija: razvijanje CO_2	+	—	+
Manometrijsko-respirometrijski test	Manometrijska respirometrija: potrošnja kisika	+	+/–	+
Test sa zatvorenim bocama	Respirometrija: otopljeni kisik	+/–	+	+
MITI	Respirometrija: potrošnja kisika	+	+/–	+

Za tumačenje dobivenih rezultata potrebne su informacije o čistoći ili relativnim udjelima glavnih komponenti ispitivane tvari, posebno ako su vrijednosti niske ili granične.

Informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije za bakterije (Dodatak 4.) mogu biti vrlo korisne za odabir prikladnih ispitnih koncentracija te mogu biti ključne za pravilno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje.

I.3. REFERENTNE TVARI

Za provjeru postupka koriste se referentne kemikalije koje ispunjavaju kriterije za laku biorazgradivost; prikladnu tikvicu s referentnom tvari treba postaviti paralelno uz obični ispitni niz.

Prikladne kemikalije su anilin (svježe destiliran), natrijev acetat i natrijev benzoat. Sve se te referentne kemikalije razgrađuju u ovim postupcima, čak i bez dodavanja inokuluma.

Predloženo je da se pronađe referentna kemikalija koja je lako biorazgradiva, ali ipak zahtijeva dodavanje inokuluma. Predložen je kalijev hidrogenftalat; međutim, da bi on bio prihvaćen kao referentna tvar, potrebno je pribaviti još dokaza.

Spojevi koji sadrže dušik mogu u respirometrijskim ispitivanjima utjecati na potrošnju kisika nitrifikacijom (vidjeti dodatke 2. i 5.).

I.4. NAČELO ISPITNIH METODA

Otopina ili suspenzija ispitivane tvari u mineralnom mediju se inokulira i inkubira u aerobnim uvjetima u mraku ili na difuznoj svjetlosti. Količina DOC-a u ispitnoj otopini koja potječe od inokuluma treba biti što manja u odnosu na količinu DOC-a koja potječe od ispitivane tvari. Kako bi se uzela u obzir endogena aktivnost inokuluma, izvode se paralelne slijepe probe s inokulumom bez ispitivane tvari, iako endogena aktivnost stanica u prisutnosti tvari neće točno odgovarati aktivnosti u endogenoj kontroli. Paralelno se izvodi ispitivanje s referentnom tvari radi provjere postupaka.

▼B

Općenito, razgradnja se prati određivanjem parametara kao što su DOC, nastajanje CO_2 i potrošnja kisika, uz provedbu mjerenja u dovoljno učestalim razmacima da se može odrediti početak i kraj biorazgradnje. Automatski spirometri omogućuju neprekidno mjerenje. DOC se ponekad mjeri dodatno uz neki drugi parametar, ali se to obično čini samo na početku i na kraju ispitivanja. Za ocjenjivanje primarne razgradnje ispitivane tvari i određivanje koncentracije nastalih intermedijera može se koristiti i specifična kemijska analiza (obvezatno kod testa MITI).

Ispitivanje u pravilu traje 28 dana. Ipak, ispitivanje se može završiti i prije 28. dana tj. čim krivulja biorazgradnje dosegne plato, na temelju najmanje tri određivanja. Ispitivanja se mogu nastaviti i nakon 28. dana ako krivulja pokazuje da je biorazgradnja započela, ali 28. dana nije postignut plato.

I.5. KRITERIJI KAKVOĆE

I.5.1. **Obnovljivost**

Zbog prirode biorazgradnje i miješanih populacija bakterija koje se koriste kao inokulumi određivanja treba provoditi najmanje dvostruko.

Iskustva pokazuju da što je veća koncentracija mikroorganizama koji se na početku dodaju u ispitni medij, to su manje razlike između višestrukih određivanja. Osim toga, prstenasti testovi su pokazali da mogu postojati velike razlike između rezultata različitih laboratorija, ali se kod spojeva koji se lako biološki razgrađuju uglavnom postiže dobra podudarnost.

I.5.2. **Valjanost ispitivanja**

Ispitivanje se smatra valjanim ako su razlike između krajnjih vrijednosti višestrukih određivanja opadanja ispitivane kemikalije na platou, na kraju ispitivanja odnosno na kraju roka od 10 dana manje od 20 % i ako je postotak razgradnje referentne tvari do 14. dana dosegao razinu za laku biorazgradivost. Ako bilo koji od ovih uvjeta nije zadovoljen, ispitivanje treba ponoviti. Zbog strogosti metoda niske vrijednosti ne znače nužno da ispitivana tvar nije biorazgradiva u okolišnim uvjetima, ali ukazuju na to da su za utvrđivanje biorazgradivosti potrebna dodatna ispitivanja.

Ako je u toksikološkom testu s ispitivanom tvari i referentnom kemikalijom razgradnja u 14 dana niža od 35 % (na temelju DOC-a) ili niža od 25 % (na temelju TPK ili $ThCO_2$), može se pretpostaviti da ispitivane kemikalije imaju inhibitorni učinak (vidjeti također Dodatak 4.). Niz ispitivanja treba ponoviti, po mogućnosti s nižom koncentracijom ispitivane kemikalije i/ili višom koncentracijom inokuluma, ali ne iznad 30 mg krute tvari po litri.

I.6. OPĆI POSTUPCI I PRIPREME

Opći uvjeti ispitivanja sažeto su prikazani u tablici 2. Aparatura i drugi pokusni uvjeti koji su specifični za pojedine testove opisani su u nastavku u pripadajućim poglavljima.

▼B

Tablica 2.

Ispitni uvjeti

Test	Test opadanja DOC-a	Test razvijanja CO_2	Manometrijsko-respirometrijski test	Izmijenjeni test pretraživanja OECD	Test sa zatvorenim bocama	MITI (I)
Koncentracija ispitivane tvari						
u mg/l			100		2 – 10	100
mg DOC/l	10 – 40	10 – 20		10 – 40		
mg TPK/l			50 – 100		5 – 10	
Koncentracija inokuluma (u stanicama/l, približno)	≤ 30 mg/l SK ili ≤ 100 ml otpadne vode/l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundarne otpadne vode/l (10^5)	≤ 5 ml otpadne vode/l (10^4 – 10^6)	30 mg/l SK (10^7 – 10^8)
Koncentracija elemenata u mineralnom mediju (u mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ±0,2					po mogućnosti 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = otopljeni organski ugljik TPK = teoretska potrošnja kisika SK = suspendirana kruta tvar

I.6.1. **Voda za razrjeđivanje**

Koristi se deionizirana ili destilirana voda koja ne sadrži inhibitorne koncentracije toksičnih tvari (npr. ioni Cu^{++}). Ona ne smije sadržavati više od 10 % organskog ugljika uvedenog putem ispitivanog materijala. Visoka čistoća ispitne vode nužna je kako bi se izbjegle visoke vrijednosti slijepih proba. Onečišćenje može proizlaziti iz unutarnjih nečistoća, ali i ionskih izmjenjivačkih smola te liziranog materijala iz bakterija i algi. Za svaki niz ispitivanja treba koristiti vodu iz iste šarže, koja je prethodno provjerena analizom DOC-a. Ova provjera nije nužna kod testa sa zatvorenim bocama, ali potrošnja kisika vode mora biti niska.

▼B

I.6.2. **Radne otopine mineralnih komponenti**

Za pripremu ispitnih otopina potrebno je pripremiti radne otopine s odgovarajućim koncentracijama mineralnih komponenti. Radne otopine u nastavku mogu se koristiti (uz različite faktore razrjeđenja) za test opadanja DOC-a, izmijenjeni test pretraživanja OECD, test razvijanja CO_2, manometrijsko-respirometrijski test i test sa zatvorenim bocama.

Faktori razrjeđenja i posebna priprema mineralnog medija za test MITI nalaze se u poglavljima koja se odnose na pojedine testove.

Radne otopine:

Pripreme se sljedeće radne otopine s analitički čistim reagensima.

(a) monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4 8,50 g

dikalijev monohidrogen ortofosfat, K_2HPO_4 21,75 g

dinatrijev monohidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

amonijev klorid, NH_4Cl 0,50 g

Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre. pH otopine treba biti 7,4.

(b) kalcijev klorid, bezvodni, $CaCl_2$ 27,50 g

ili kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.

(c) magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g

Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.

(d) željezo (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.

Napomena: Kako se ova otopina ne bi morala pripremati neposredno prije uporabe, može se dodati jedna kap konc. HCl ili 0,4 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) po litri.

I.6.3. **Radne otopine kemikalija**

Na primjer, ako je topljivost viša od 1 g/l, 1 – 10 g (prema potrebi) ispitivane odnosno referentne kemikalije se otopi u deioniziranoj vodi i nadopuni do 1 litre. U protivnom se radne otopine pripremaju u mineralnom mediju, ili se kemikalija izravno dodaje u mineralni medij. Za postupanje s manje topljivim tvarima vidjeti Dodatak 3., s time da se kod testa MITI (metoda C.4.-F) ne smiju koristiti ni otapala ni emulgatori.

▼B

I.6.4. **Inokulumi**

Inokulum se može dobiti iz različitih izvora: aktivni mulj, otpadne vode (neklorirane), površinske vode i tla ili iz kombinacije tih izvora. Ako se kod provedbe testa opadanja DOC-a, testa razvijanja CO_2 ili manometrijsko-respirometrijskog testa koristi aktivni mulj, treba ga uzeti iz postrojenja za pročišćavanje ili laboratorijske jedinice u koju pretežito ulazi komunalna otpadna voda. Pokazalo se da se korištenjem inokuluma iz drugih izvora dobiva veće raspršenje rezultata. Za izmijenjeni test pretraživanja OECD i test sa zatvorenim bocama potreban je razrjeđeniji inokulum bez pahuljica mulja, po mogućnosti dobiven iz sekundarne otpadne vode postrojenja ili laboratorijske jedinice za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda. Inokulum za test MITI dobiva se iz kombinacije izvora, a opisan je u poglavlju koje se odnosi na taj test.

I.6.4.1. *Inokulum iz aktivnog mulja*

Uzme se svježi uzorak aktivnog mulja iz aeracijskog bazena postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili laboratorijske jedinice koja pretežito pročišćava komunalne otpadne vode. Grube čestice se prema potrebi uklone filtriranjem kroz fino sito te se mulj nakon tog održava aerobnim.

Kao druga mogućnost, mulj se nakon uklanjanja grubih čestica može istaložiti ili centrifugirati (npr. 10 minuta na 100 g). Supernatant se baca. Mulj se može oprati u mineralnom mediju. Koncentrirani se mulj suspendira u mineralnom mediju tako da se dobije koncentracija od 3 – 5 g suspendirane krute tvari/l i dozračuje do uporabe.

Mulj treba uzeti iz ispravnog konvencionalnog uređaja. Ako se mulj mora uzeti iz brzih pročišćivača ili se sumnja da sadrži inhibitore, treba ga oprati. Resuspendirani mulj se nakon temeljitog miješanja pusti da se istaloži ili centrifugira, supernatant se baci i oprani mulj ponovno resuspendira u dodatnoj količini mineralnog medija. Ovaj se postupak ponavlja sve dok u mulju ima viška supstrata ili inhibitora.

Nakon što se postigne potpuna resuspenzija kao i u slučaju neobrađenog mulja, neposredno prije uporabe treba uzeti uzorak i odrediti suhu masu suspendirane krute tvari.

Još jedna od mogućnosti je homogenizacija aktivnog mulja (3 – 5 g suspendirane krute tvari/l). Mulj se obradi u mehaničkoj mješalici dvije minute na srednjoj brzini. Izmiješani se mulj pusti da se istaloži 30 minuta, prema potrebi i duže, nakon čega se tekućina koja će se koristiti kao inokulum pretače u omjeru 10 ml po litri mineralnog medija.

I.6.4.2. *Ostali izvori inokuluma*

Inokulum se može dobiti iz sekundarne otpadne vode postrojenja za pročišćavanje ili laboratorijske jedinice u koju pretežito ulaze komunalne otpadne vode. Uzme se svježi uzorak i održava aerobnim tijekom prijenosa. Pusti se da se istaloži 1 sat ili profiltrira kroz grubi filtar-papir i pretočena otpadna voda odnosno filtrat održava aerobnim do uporabe. Ova vrsta inokuluma može se koristiti u omjeru do 100 ml po litri medija.

▼B

Jedan od izvora inokuluma je i površinska voda. U tom se slučaju uzorak uzme iz prikladne površinske vode, npr. rijeka, jezero te se održava aerobnim do uporabe. Inokulum se prema potrebi može koncentrirati filtracijom ili centrifugiranjem.

I.6.5. **Prethodno kondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može prethodno kondicionirati radi prilagodbe na pokusne uvjete, ali se ne smije prilagođavati na ispitivanu kemikaliju. Kondicioniranje se sastoji u dozračivanju aktivnog mulja u mineralnom mediju odnosno sekundarne otpadne vode pet do sedam dana na ispitnoj temperaturi. Kondicioniranje ponekad može povećati preciznost ispitnih metoda smanjivanjem vrijednosti slijepih proba. Smatra se da je nepotrebno kondicionirati inokulum za test MITI.

I.6.6. **Abiotičke kontrole**

Kad je to potrebno, obavlja se provjera abiotičke razgradnje ispitivane tvari određivanjem opadanja DOC-a, potrošnje kisika odnosno razvijanja ugljikovog dioksida u sterilnim kontrolama bez inokuluma. Sterilizacija se provodi filtriranjem kroz membranu (0,2 – 0,45 mikrometara) ili dodavanjem prikladne toksične tvari u odgovarajućoj koncentraciji. Ako se koristi membranska filtracija, uzorci se uzimaju aseptički kako bi se održala sterilnost. Ako adsorpcija ispitivane kemikalije nije unaprijed isključena, u ispitivanja kod kojih se biorazgradnja mjeri kao opadanje DOC-a treba uključiti inokuliranu i otrovanu abiotičku kontrolu, posebno ako se kao inokulum koristi aktivni mulj.

I.6.7. **Broj tikvica**

Broj tikvica u tipičnom ispitivanju naveden je u poglavljima koja se odnose na pojedine testove.

Mogu se koristiti sljedeće vrste tikvica:

— ispitna suspenzija: sadrži ispitivanu tvar i inokulum,

— slijepa proba inokuluma: sadrži samo inokulum,

— kontrola postupka: sadrži referentnu tvar i inokulum,

— abiotička sterilna kontrola: sterilna, sadrži ispitivanu tvar (vidjeti 1.6.6.),

— kontrola adsorpcije: sadrži ispitivanu tvar, inokulum i sredstvo za sterilizaciju,

— kontrola toksičnosti: sadrži ispitivanu tvar, referentnu tvar i inokulum.

Određivanje u ispitnoj suspenziji i slijepoj probi inokuluma mora se obavezno provoditi paralelno. Preporučljivo je da se i određivanja u drugim tikvicama provode paralelno.

Ipak, to nije uvijek moguće. Treba voditi računa da se uzme dovoljno uzoraka odnosno da se napravi dovoljno očitavanja kako bi se mogao odrediti postotak opadanja unutar roka od 10 dana.

▼B

I.7. PODACI I VREDNOVANJE

Za izračunavanje D_t (postotak razgradnje) koriste se srednje vrijednosti dvostrukog mjerenja parametra u ispitnim posudama i slijepoj probi inokuluma. Formule su navedene u nastavku u odjeljcima koji se odnose na pojedine testove. Tijek razgradnje treba prikazati grafički i označiti rok od 10 dana. Treba izračunati i navesti postotak opadanja na kraju roka od 10 dana i vrijednost na platou odnosno na kraju ispitivanja, ovisno o slučaju.

Spojevi koji sadrže dušik mogu kod respirometrijskih ispitivanja utjecati na potrošnju kisika nitrifikacijom (vidjeti dodatke 2. i 5.).

I.7.1. **Mjerenje razgradnje putem određivanja DOC-a**

Da bi se mogla ocijeniti valjanost ispitivanja (vidjeti I.5.2.), za tikvice koje sadrže ispitivanu tvar treba zasebno izračunati postotak razgradnje D_t u svakom vremenu uzorkovanja, koristeći srednje vrijednosti dvostrukog mjerenja DOC-a. On se izračunava pomoću sljedeće jednadžbe:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

gdje je:

D_t = % razgradnje u vremenu t

C_o = srednja početna koncentracija DOC-a u inokuliranom mediju koji sadrži ispitivanu tvar (mg DOC/l)

C_t = srednja koncentracija DOC-a u inokuliranom mediju koji sadrži ispitivanu tvar u vremenu t (mg DOC/l)

C_{bo} = srednja početna koncentracija DOC-a u inokuliranom mineralnom mediju slijepe probe (mg DOC/l)

C_{bt} = srednja koncentracija DOC-a u inokuliranom mineralnom mediju slijepe probe u vremenu t (mg DOC/l)

Sve se koncentracije mjere pokusom.

I.7.2. **Mjerenje razgradnje putem specifične analize**

Ako su raspoloživi specifični analitički podaci, primarna se biorazgradnja izračunava kao:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

gdje je:

D_t = % razgradnje u vremenu t, obično 28 dana

S_a = preostala količina ispitivane tvari u inokuliranom mediju na kraju ispitivanja (mg)

S_b = preostala količina ispitivane tvari u slijepoj probi s vodom/medijem kojemu je dodana samo ispitivana tvar (mg)

▼B

I.7.3. **Abiotička razgradnja**

Ako se koristi abiotička sterilna kontrola, postotak abiotičke razgradnje izračunava se kao:

$$\% \text{ abioičke razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

gdje je:

$C_{s(o)}$ = koncentracija DOC-a u sterilnoj kontroli na dan 0

$C_{s(t)}$ = koncentracija DOC-a u sterilnoj kontroli na dan t

I.8. IZVJEŠĆIVANJE

Izvješće o ispitivanju po mogućnosti sadrži sljedeće:

— ispitivana i referentna kemikalija i njihova čistoća,

— ispitni uvjeti,

— inokulum: vrsta i mjesto(-a) uzimanja uzoraka, koncentracija i prethodno kondicioniranje,

— udio i vrsta industrijskog otpada koji je prisutan u otpadnoj vodi, ako je poznato,

— trajanje ispitivanja i temperatura,

— ako se ispituju slabo topljive kemikalije, provedena obrada,

— primijenjena ispitna metoda; kod svih promjena postupka treba navesti znanstvene argumente i objašnjenje,

— obrazac za dostavu podataka,

— sve uočene pojave inhibicije,

— abiotička razgradnja (ako je uočena),

— podaci iz specifične kemijske analize, ako su raspoloživi,

— analitički podaci o intermedijerima, ako su raspoloživi,

— graf postotka razgradnje u vremenu za ispitivanu i referentnu tvar; treba jasno označiti fazu prilagodbe („lag” fazu), fazu razgradnje, rok od 10 dana i nagib (Dodatak 1.). Ako je ispitivanje zadovoljilo kriterije valjanosti, za graf se može koristiti srednja vrijednost postotaka razgradnje tikvica koje sadrže ispitivanu tvar,

— postotak opadanja nakon roka od 10 dana i na platou odnosno na kraju ispitivanja.

II. DIO **TEST OPADANJA DOC-a**(metoda C.4.-A)

II.1. NAČELO METODE

Izmjereni volumen inokuliranog mineralnog medija koji sadrži poznatu koncentraciju ispitivane tvari (10 – 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljika dozračuje se u mraku ili na difuznoj svjetlosti na 22 ± 2 °C.

▼B

Razgradnja se prati analizom DOC-a, koja se provodi u učestalim razmacima tijekom razdoblja od 28 dana. Stupanj biorazgradnje izračunava se kao opadanje koncentracije DOC-a (ispravljeno za vrijednost slijepe probe s inokulumom), izraženo u postotku početne koncentracije. Stupanj primarne biorazgradnje može se izračunati iz dopunske kemijske analize učinjene na početku i kraju inkubacije.

II.2. OPIS METODE

II.2.1. **Aparatura**

(a) stožaste tikvice npr. 250 ml do 2 l, ovisno o volumenu koji je potreban za analizu DOC-a;

(b) tresilica za stožaste tikvice s automatskom regulacijom temperature, ili smještena u prostoru sa stalnom temperaturom, koja ima dovoljnu snagu za održavanje aerobnih uvjeta u svim tikvicama;

(c) uređaj za filtraciju, s prikladnim membranama;

(d) analizator DOC-a;

(e) uređaj za određivanje otopljenog kisika;

(f) centrifuga.

II.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Za pripremu radnih otopina vidjeti I.6.2.

Pomiješa se 10 ml otopine (a) s 800 ml vode za razrjeđivanje, doda 1 ml otopina (b) do (d) i nadopuni vodom za razrjeđivanje do 1 l.

II.2.3. **Priprema i prethodno kondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može dobiti iz različitih izvora: aktivni mulj, otpadne vode, površinske vode, tla ili iz kombinacije tih izvora.

Vidjeti I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

II.2.4. **Priprema tikvica**

Na primjer, u stožaste tikvice od 2 l uvede se po 800 ml mineralnog medija i doda dovoljna količina radne otopine ispitivane odnosno referentne tvari da se dobije koncentracija kemikalije koja odgovara 10 – 40 mg DOC/l. Provjere se pH vrijednosti i prema potrebi podese na 7,4. Tikvice se inokuliraju aktivnim muljem ili drugim izvorom inokuluma (vidjeti I.6.4.) tako da se dobije konačna koncentracija do najviše 30 mg suspendirane krute tvari po litri. Usto se pripreme kontrole s inokulumom u mineralnom mediju bez ispitivane i referentne kemikalije.

Jedna se posuda prema potrebi koristi za provjeru mogućeg inhibitornog učinka ispitivane kemikalije; u tu se svrhu inokulira otopina koja sadrži usporedive koncentracije ispitivane i referentne kemikalije u mineralnom mediju.

Ako je to potrebno, treba pripremiti još jednu sterilnu tikvicu za provjeru abiotičke razgradnje ispitivane kemikalije, koja sadrži neinokuliranu otopinu kemikalije (vidjeti I.6.6.).

▼B

Osim toga, ako se sumnja da se ispitivana kemikalija značajno adsorbira na staklo, mulj itd., treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se odredio vjerojatni obim adsorpcije, a time i prikladnost testa za tu kemikaliju (vidjeti tablicu 1.). Pripremi se tikvica koja sadrži ispitivanu kemikaliju, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

Sve se tikvice nadopune mineralnim medijem do 1 l te se nakon miješanja iz svake tikvice uzme uzorak za određivanje početne koncentracije DOC-a (vidjeti Dodatak 2.4.). Otvori tikvica se prekriju npr. aluminijskom folijom na način koji omogućuje slobodnu izmjenu zraka između tikvice i okolnog zraka. Zatim se posude stave u tresilicu i započinje se s ispitivanjem.

II.2.5. **Broj tikvica u tipičnom ispitivanju**

Tikvica 1 i 2: ispitna suspenzija

Tikvica 3 i 4: slijepa proba inokuluma

Tikvica 5: kontrola postupka

po mogućnosti odnosno prema potrebi:

Tikvica 6: abiotička sterilna kontrola

Tikvica 7: kontrola adsorpcije

Tikvica 8: kontrola toksičnosti

Vidjeti također I.6.7.

II.2.6. **Provođenje ispitivanja**

Koncentracije DOC-a se tijekom ispitivanja određuju dvostruko u svim tikvicama u poznatim vremenskim razmacima, koji moraju biti dovoljno učestali da se može odrediti početak roka od 10 dana i postotak opadanja na kraju roka od 10 dana. Kod svakog određivanja treba uzeti samo nužnu količinu ispitne suspenzije.

Prije uzimanja uzorka, u tikvicama se prema potrebi nadoknade gubici uslijed isparavanja dodavanjem potrebne količine vode za razrjeđivanje (I.6.1.). Medij se prije uzimanja uzorka temeljito promiješa, pazeći da se materijal koji prianja uz stijenke posuda prije uzorkovanja otopi odnosno suspendira. Uzorak se odmah nakon uzorkovanja filtrira kroz membranski filtar ili centrifugira (vidjeti Dodatak 2.4.). Filtrirane odnosno centrifugirane uzorke treba analizirati istog dana; u protivnome ih treba pohraniti na temperaturi od 2 – 4 °C do najviše 48 sati ili, u dužem vremenu, ispod -18 °C.

II.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

II.3.1. **Obrada rezultata**

Izračuna se postotak razgradnje u vremenu t, kako je navedeno u I.7.1. (određivanje DOC-a) i, fakultativno, u I.7.2. (specifična analiza).

Svi se rezultati upišu u odgovarajuće obrasce za dostavu podataka.

▼B

II.3.2. **Valjanost rezultata**

Vidjeti I.5.2.

II.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

II.4. OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

Primjer obrasca nalazi se u nastavku.

TEST OPADANJA DOC-a

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: … mg/l kao kemikalija

Početna koncentracija u mediju, t_0: … mg/l kao kemikalija

4. **INOKULUM**

Izvor:

Obrada:

Prethodno kondicioniranje, ako se provodi:

Koncentracija suspendirane krute tvari u reakcijskoj smjesi: mg/l

5. **ODREĐIVANJA UGLJIKA**

Analizator ugljika:

	Tikvica br.		DOC nakon n dana (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ispitivana kemikalija plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja vrijednost $C_{a(t)}$					
	2	b1					
		b2					
		b, srednja vrijednost $C_{b(t)}$					

▼B

	Tikvica br.		DOC nakon n dana (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slijepa proba s inokulumom bez ispitivane kemikalije	3	C_1					
		C_2					
		C, srednja vrijednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrijednost $C_{d(t)}$					
	$C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOVANJE SIROVIH PODATAKA**

Tikvica br.		% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{b1(t)}}{C_{a(o)} - C_{b1(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{b1(t)}}{C_{b(o)} - C_{b1(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrijednost (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 i D_2 se ne uprosječuju ako se vrijednosti znatno razlikuju.

Napomena: Slični se obrasci mogu koristiti za referentnu kemikaliju i kontrolu toksičnosti.

7. **ABIOTIČKA KONTROLA (fakultativno)**

	Vrijeme (dani)	
	0	t
Konc. DOC (mg/l) u sterilnoj kontroli	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abioičke razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA**(fakultativno)

	preostala količina ispitivane kemikalije na kraju ispitivanja (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilna kontrola	S_b	

▼B

	preostala količina ispitivane kemikalije na kraju ispitivanja (mg/l)	% primarne razgradnje
Inokulirani ispitni medij	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DIO III. **IZMIJENJENI TEST PRETRAŽIVANJA OECD**(metoda C.4.-B)

III.1. NAČELO METODE

Izmjereni volumen mineralnog medija koji sadrži poznatu koncentraciju ispitivane tvari (10 – 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljika inokulira se s 0,5 ml otpadne vode po litri medija. Smjesa se dozračuje u mraku ili na difuznoj svjetlosti na 22 ± 2 °C.

Razgradnja se prati analizom DOC-a, koja se provodi u učestalim razmacima tijekom razdoblja od 28 dana. Stupanj biorazgradnje izračunava se kao opadanje koncentracije DOC-a (ispravljeno za vrijednost slijepe probe s inokulumom), izraženo u postotku početne koncentracije. Stupanj primarne biorazgradnje može se izračunati iz dopunske kemijske analize učinjene na početku i kraju inkubacije.

III.2. OPIS METODE

III.2.1. **Aparatura**

(a) stožaste tikvice npr. od 250 ml do 2 l, ovisno o volumenu koji je potreban za analizu DOC-a;

(b) tresilica – za stožaste tikvice, s automatskom regulacijom temperature ili smještena u prostoriji sa stalnom temperaturom, koja ima dovoljnu snagu za održavanje aerobnih uvjeta u svim tikvicama;

(c) uređaj za filtraciju, s prikladnim membranama;

(d) analizator DOC-a;

(e) uređaj za određivanje otopljenog kisika;

(f) centrifuga.

II.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Za pripremu radnih otopina vidjeti I.6.2.

Pomiješa se 10 ml otopine (a) s 80 ml vode za razrjeđivanje, doda 1 ml otopina (b) do (d) i nadopuni vodom za razrjeđivanje do 1 l.

Kod ove se metode kao inokulum koristi samo 0,5 ml otpadne vode po litri, tako da je medij ponekad potrebno pojačati elementima u tragovima i faktorima rasta. To se može učiniti dodavanjem 1 ml svake od ovih otopina po litri konačnog medija:

▼B

otopina elemenata u tragovima:

manganov sulfat tetrahidrat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
borna kiselina, H_3BO_3	57,2 mg
cinkov sulfat heptahidrat, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
amonijev heptamolibdat $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe kelat ($FeCl_3$ etilendiamintetraoctena kiselina)	100,0 mg

Otopiti u vodi za razrjeđivanje i nadopuniti vodom za razrjeđivanje do 1 000 ml.

Vitaminska otopina:

ekstrakt kvasca	15,0 mg

Ekstrakt kvasca otopi se u 100 ml vode. Sterilizira se propuštanjem kroz membranski filtar od 0,2 mikrona ili svježe pripremi.

III.2.3. **Priprema i prethodno kondicioniranje inokuluma**

Inokulum se dobiva iz sekundarne otpadne vode postrojenja za pročišćavanje ili laboratorijske jedinice u koju pretežito ulaze komunalne otpadne vode. Vidjeti I.6.4.2. i I.6.5.

Koristi se 0,5 ml po litri mineralnog medija.

III.2.4. **Priprema tikvica**

Na primjer, u stožaste tikvice od 2 l uvede se po 800 ml mineralnog medija i doda dovoljna količina radne otopine ispitivane odnosno referentne tvari da se dobije koncentracija kemikalije koja odgovara 10 – 40 mg DOC/l. Provjeri se pH vrijednost i prema potrebi podesi na 7,4. Tikvice se inokuliraju otpadnom vodom u omjeru 0,5 ml/l (vidjeti I.6.4.2.). Usto se pripreme kontrole s inokulumom u mineralnom mediju bez ispitivane i referentne kemikalije.

Jedna se posuda prema potrebi koristi za provjeru mogućeg inhibitornog učinka ispitivane kemikalije; u tu se svrhu inokulira otopina koja sadrži usporedive koncentracije ispitivane i referentne kemikalije u mineralnom mediju.

Ako je to potrebno, treba pripremiti još jednu sterilnu tikvicu za provjeru abiotičke razgradnje ispitivane kemikalije, koja sadrži neinokuliranu otopinu kemikalije (vidjeti I.6.6.).

Osim toga, ako se sumnja da se ispitivana kemikalija značajno adsorbira na staklo, mulj itd., treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se odredio vjerojatni obim adsorpcije, a time i prikladnost testa za tu kemikaliju (vidjeti tablicu 1.). Pripremi se tikvica koja sadrži ispitivanu kemikaliju, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

Sve se tikvice nadopune mineralnim medijem do 1 l te se nakon miješanja iz svake tikvice uzme uzorak za određivanje početne koncentracije DOC-a (vidjeti Dodatak 2.4.). Otvori tikvica prekriju se npr. aluminijskom folijom na način koji omogućuje slobodnu izmjenu zraka između tikvice i okolnog zraka. Zatim se posude stave u tresilicu i započinje s ispitivanjem.

▼B

III.2.5. **Broj tikvica u tipičnom ispitivanju**

Tikvica 1 i 2: ispitna suspenzija

Tikvica 3 i 4: slijepa proba inokuluma

Tikvica 5: kontrola postupka

te po mogućnosti odnosno prema potrebi:

Tikvica 6: abiotička sterilna kontrola

Tikvica 7: kontrola adsorpcije

Tikvica 8: kontrola toksičnosti

Vidjeti također 1.6.7.

III.2.6. **Provođenje ispitivanja**

Koncentracije DOC-a se tijekom ispitivanja određuju dvostruko u svim tikvicama u poznatim vremenskim razmacima, koji moraju biti dovoljno učestali da se može odrediti početak roka od 10 dana i postotak opadanja na kraju roka od 10 dana. Kod svakog određivanja treba uzeti samo nužnu količinu ispitne suspenzije.

Prije uzimanja uzorka, u tikvicama se prema potrebi nadoknade gubici uslijed isparavanja dodavanjem potrebne količine vode za razrjeđivanje (I.6.1.). Medij se prije uzimanja uzorka temeljito promiješa, pazeći da se materijal koji prianja uz stijenke posuda prije uzorkovanja otopi odnosno suspendira. Uzorak se odmah nakon uzorkovanja filtrira kroz membranski filtar ili centrifugira (vidjeti Dodatak 2.4.). Filtrirane odnosno centrifugirane uzorke treba analizirati istog dana; u protivnome ih treba pohraniti na temperaturi od 2 – 4 °C do najviše 48 sati ili, u dužem vremenu, ispod – 18 °C.

III.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

III.3.1. **Obrada rezultata**

Izračuna se postotak razgradnje u vremenu t, kako je navedeno u I.7.1. (određivanje DOC-a) i, fakultativno, u 1.7.2. (specifična analiza).

Svi se rezultati upišu u odgovarajuće obrasce za dostavu podataka.

III.3.2. **Valjanost rezultata**

Vidjeti I.5.2.

III.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

III.4. OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

Primjer obrasca nalazi se u nastavku

IZMIJENJENI TEST PRETRAŽIVANJA OECD

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

▼B

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: … mg/l kao kemikalija

Početna koncentracija u mediju, t_0: … mg/l kao kemikalija

4. **INOKULUM**

Izvor:

Obrada:

Prethodno kondicioniranje, ako se provodi:

Koncentracija suspendirane krute tvari u reakcijskoj smjesi: mg/l

5. **ODREĐIVANJA UGLJIKA**

Analizator ugljika:

	Tikvica br.		DOC nakon n dana (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ispitivana kemikalija plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja vrijednost $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, srednja vrijednost $C_{b(t)}$					
Slijepa proba s inokulumom bez ispitivane kemikalije	3	C_1					
		C_2					
		C, srednja vrijednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrijednost $C_{d(t)}$					
	$C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOVANJE SIROVIH PODATAKA**

Tikvica br.		% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{b1(t)}}{C_{a(o)} - C_{b1(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Tikvica br.		% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{b1(t)}}{C_{b(o)} - C_{b1(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrijednost (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 i D_2 se ne uprosječuju ako se vrijednosti znatno razlikuju.

Napomena: Slični se obrasci mogu koristiti za referentnu kemikaliju i kontrolu toksičnosti.

7. **ABIOTIČKA KONTROLA (fakultativno)**

	Vrijeme (dani)	
	0	t
Konc. DOC (mg/l) u sterilnoj kontroli	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abioičke razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA**(fakultativno)

	preostala količina ispitivane kemikalije na kraju ispitivanja (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilna kontrola	S_b	
Inokulirani ispitni medij	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. DIO TEST RAZVIJANJA CO_2 (metoda C.4.-C)

IV.1. NAČELO METODE

Izmjereni volumen inokuliranog mineralnog medija koji sadrži poznatu koncentraciju ispitivane kemikalije (10 – 20 mg DOC ili TOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljika dozračuje se uvođenjem zraka bez ugljikovog dioksida kontroliranom brzinom u mraku ili na difuznoj svjetlosti. Razgradnja se prati tijekom 28 dana određivanjem nastalog ugljikovog dioksida koji je vezan u barijevom ili natrijevom hidroksidu i koji se mjeri titracijom preostalog hidroksida ili kao anorganski ugljik. Količina ugljikovog dioksida oslobođena iz ispitivane kemikalije (ispravljena za vrijednost slijepe probe inokuluma) izražava se kao postotak $ThCO_2$. Stupanj biorazgradnje može se izračunati i iz dopunske analize DOC-a učinjene na početku i kraju inkubacije.

▼B

IV.2. OPIS METODE

IV.2.1. **Aparatura**

(a) tikvice 2 – 5 litara s cjevčicom za dozračivanje koja seže gotovo do dna posude i ispustom;

(b) magnetske mješalice, kod ocjenjivanja slabo topljivih kemikalija;

(c) boce za apsorpciju plina;

(d) uređaj za regulaciju i mjerenje protoka zraka;

(e) uređaj za ispiranje ugljikovog dioksida, za pripremu zraka bez ugljikovog dioksida; umjesto tog može se koristiti smjesa kisika bez CO_2 i dušika bez CO_2 iz plinskih boca u odgovarajućem omjeru (20 % O_2: 80 % N_2);

(f) uređaj za određivanje ugljikovog dioksida, bilo titracijom ili putem analizatora organskog ugljika;

(g) uređaj za membransku filtraciju (prema izboru);

(h) analizator DOC-a (prema izboru).

IV.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Za pripremu radnih otopina vidjeti I.6.2.

Pomiješa se 10 ml otopine (a) s 800 ml vode za razrjeđivanje, doda 1 ml otopina (b) do (d) i nadopuni vodom za razrjeđivanje do 1 l.

IV.2.3. **Priprema i prethodno kondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može dobiti iz različitih izvora: aktivni mulj, otpadne vode, površinske vode, tla ili iz kombinacije tih izvora.

Vidjeti I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

IV.2.4. **Priprema tikvica**

Volumeni i mase navedeni u nastavku vrijede za 5-litarske tikvice koje sadrže 3 l suspenzije. Ako se koriste manji volumeni, vrijednosti treba proporcionalno izmijeniti, vodeći računa da se nastali ugljikov dioksid mora točno mjeriti.

U svaku tikvicu od 5 litara stavi se 2 400 ml mineralnog medija. Doda se odgovarajući volumen pripremljenog aktivnog mulja (vidjeti I.6.4.1. i I.6.5.), tako da se u konačnoj inokuliranoj smjesi od 3 l dobije koncentracija suspendirane krute tvari do najviše 30 mg/l. Druga je mogućnost da se pripremljeni mulj prvo razrijedi, tako da se dobije suspenzija u mineralnom mediju od 500 – 1 000 mg/l, i alikvot doda sadržaju 5-litarske tikvice kako bi se dobila koncentracija od 30 mg/l; ovo osigurava veću preciznost. Mogu se koristiti i drugi izvori inokuluma (vidjeti I.6.4.2.).

Inokulirane smjese se preko noći dozračuju zrakom bez CO_2 kako bi se sustav očistio od ugljikovog dioksida.

▼B

Ispitivana i referentna tvar dodaju se odvojeno u paralelne tikvice kao radne otopine poznatog volumena tako da se dobiju koncentracije dodanih kemikalija od 10 do 20 mg DOC ili TOC/l; nekoliko tikvica bez kemikalija koristi se za kontrolu inokuluma. Slabo topljive ispitivane tvari treba dodati izravno u tikvice na bazi mase ili volumena ili s njima postupati kako je opisano u Dodatku 3.

Jedna se tikvica prema potrebi koristi za provjeru mogućeg inhibitornog učinka ispitivane kemikalije; za to u posudu treba dodati ispitivanu i referentnu kemikaliju u koncentracijama koje se koriste u ostalim tikvicama.

Ako je to potrebno, jednu sterilnu tikvicu koja sadrži neinokuliranu otopinu kemikalije treba upotrijebiti za provjeru abiotičke razgradnje ispitivane kemikalije (vidjeti I.6.6.). Sterilizacija se provodi dodavanjem toksične tvari u odgovarajućoj koncentraciji.

Volumeni suspenzija u svim tikvicama nadopune se do 3 l dodavanjem mineralnog medija koji je prethodno dozračen zrakom bez CO_2. Uzorci se po izboru mogu uzeti za analizu DOC-a (vidjeti Dodatak 2.4.) i/ili specifičnu analizu. Apsorpcijske boce treba spojiti na ispuste tikvica.

Ako se koristi barijev hidroksid, na svaku se 5-litarsku tikvicu spoje tri apsorpcijske boce u nizu, od kojih svaka sadrži 100 ml 0,0125 M otopine barijevog hidroksida. Otopina ne smije sadržavati nataloženi sulfat i karbonat i njezinu jakost treba odrediti neposredno prije uporabe. Ako se koristi natrijev hidroksid, priključe se dva odvajača, od kojih drugi služi kao kontrola kako bi se pokazalo da je prvi odvajač apsorbirao sav ugljikov dioksid. Prikladne su apsorpcijske boce sa zatvaračem za serumske bočice. U svaku se bocu doda 200 ml 0,05 M natrijevog hidroksida, što je dovoljno da se apsorbira čitava količina ugljikovog dioksida koja nastaje kod potpune razgradnje ispitivane kemikalije. Otopina natrijevog dioksida, čak i onda ako je svježe pripremljena, sadrži tragove karbonata; stoga je potrebno učiniti ispravak oduzimanjem karbonata u slijepoj probi.

IV.2.5. **Broj tikvica u tipičnom ispitivanju**

Tikvica 1 i 2: ispitna suspenzija

Tikvica 3 i 4: slijepa proba inokuluma

Tikvica 5: kontrola postupka

te po mogućnosti odnosno prema potrebi:

Tikvica 6: abiotička sterilna kontrola

Tikvica 7: kontrola toksičnosti

Vidjeti također I.6.7.

IV.2.6. **Provođenje ispitivanja**

Ispitivanje započinje propuhivanjem zraka bez CO_2 kroz suspenzije brzinom od 30 – 100 ml/min. Uzorci apsorbensa ugljikovog dioksida uzimaju se periodički radi analize sadržaja CO_2. Preporučuje se da se tijekom prvih deset dana analiza provodi svaki drugi ili treći dan, a nakon toga svaki peti dan sve do 28. dana, kako bi se mogao utvrditi rok od 10 dana.

▼B

28. dana uzmu se uzorci za analizu DOC-a i/ili specifičnu analizu (po izboru), izmjeri se pH suspenzija i u svaku tikvicu doda 1 ml koncentrirane klorovodične kiseline; tikvice se dozračuju preko noći kako bi se iz ispitnih suspenzija istjerao ugljikov dioksid. 29. dana se provede zadnja analiza razvijenog ugljikovog dioksida.

U dane mjerenja CO_2 apsorber s barijevim hidroksidom najbliži tikvici odspoji se i hidroksidna se otopina titrira s HCl 0,05 M, koristeći fenolftalein kao indikator. Ostali apsorberi se pomaknu za jedno mjesto bliže tikvici i na kraj niza postavi novi apsorber koji sadrži 100 ml svježeg 0,0125 M barijevog hidroksida. Titracija se provodi prema potrebi, npr. kad se uoči znatno taloženje u prvom odvajaču, ali prije nego što ono postane vidljivo u drugom odvajaču, a najmanje jedanput tjedno. Druga mogućnost, ako se kao apsorbens koristi NaOH, je da se u apsorberu bliže tikvici špricom uzme mali uzorak (ovisno o svojstvima analizatora ugljika koji se koristi) otopine natrijevog hidroksida. Uzorak se uštrca u dio analizatora ugljika za anorganski ugljik i izravno analizira razvijeni ugljikovog dioksid.

Sadržaj drugog odvajača analizira se samo na kraju ispitivanja, kako bi se mogao učiniti ispravak za mogući prijenos ugljikovog dioksida.

IV.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

IV.3.1. **Obrada rezultata**

Količina CO_2 vezana u apsorberu određuje se kod titracije kao:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

gdje je:

V = volumen HCl upotrijebljen za titraciju 100 ml u apsorberu (ml)

C_B = koncentracija otopine barijevog hidroksida (M)

C_A = koncentracija otopine klorovodične kiseline (M)

ako je C_B 0,0125 M i C_A je 0,05 M, za titraciju 100 ml barijevog hidroksida potrebno je 50 ml, a masa CO_2 je:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml titrirane HCl} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Dakle, u ovom slučaju, faktor za pretvorbu volumena HCl upotrijebljenog u titraciji u mg CO_2 je 1,1.

Masa CO_2 oslobođena iz samog inokuluma i masa CO_2 oslobođena iz inokuluma s ispitivanom kemikalijom izračunava se uz pomoć odgovarajućih titracijskih vrijednosti, a razlika je masa CO_2 oslobođena iz same ispitivane kemikalije.

Na primjer, ako se titracijom samog inokuluma dobije vrijednost 48 ml, a inokuluma s ispitivanom kemikalijom 45 ml,

CO_2 iz inokuluma = $1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2$ mg

▼B

CO_2 iz inokuluma s ispitivanom kemikalijom = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg

te je, prema tomu, masa CO_2 oslobođena iz ispitivane kemikalije 3,3 mg.

Postotak biorazgradnje izračunava se kao:

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg oslobođenog } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg dodane ispitivane kemikalije}}$$

ili

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg oslobođenog } CO_2 \times 100}{\text{mg TO dodanog u ispitivanju} \times 3{,}67}$$

pri čemu je 3,67 faktor konverzije (44/12) ugljika u ugljikov dioksid.

Postotak razgradnje nakon bilo kojeg vremena dobije se zbrajanjem postotnih vrijednosti $ThCO_2$ izračunanih za svaki dan mjerenja do tog vremena.

Kod apsorbera s natrijevim hidroksidom količina oslobođenog ugljikovog dioksida, izražena kao IC (mg), izračunava se množenjem koncentracije IC u apsorbensu volumenom apsorbensa.

Postotak razgradnje izračunava se kao:

$$\% ThCO_2 = \frac{\text{mg IC u tikvici} - \text{mg IC slijepe probe}}{\text{MG TOC dodan kao ispitivana kemikalija}} \times 100$$

Opadanja DOC-a (fakultativno) izračunava se kako je opisano u I.7. Te i sve druge rezultate treba upisati u odgovarajuće obrasce.

IV.3.2. **Valjanost rezultata**

Sadržaj IC u suspenziji ispitivane kemikalije u mineralnom mediju na početku ispitivanja mora biti ispod 5 % TC, a ukupni CO_2 razvijen u slijepoj probi inokuluma na kraju ispitivanja u pravilu ne bi smio biti viši od 40 mg/l medija. Ako se dobiju vrijednosti iznad 70 mg CO_2/l, treba kritički preispitati podatke i pokusnu tehniku.

Vidjeti također I.5.2.

IV.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

IV.4. OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

Primjer obrasca nalazi se u nastavku.

TEST RAZVIJANJA UGLJIKOVOG DIOKSIDA

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: … mg/l kao kemikalija

▼B

Početna koncentracija u mediju: … mg/l kao kemikalija

Ukupni C dodan u tikvicu: … mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Izvor:

Obrada:

Prethodno kondicioniranje, ako se provodi:

Koncentracija suspendirane krute tvari u reakcijskoj smjesi: mg/l

Vrijeme (dan)	Oslobođeni CO_2 Ispitivanje (mg)		Oslobođeni CO_2 Slijepa proba (mg)		Oslobođeni CO_2 kumulativno (mg) (ispitivanje minus slijepa proba, srednja vrijednost)		$ThCO_2$ kumulativno $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	srednja vrijednost	3 / 4	srednja vrijednost	1	2	1	2	srednja vrijednost
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Napomena: Slični se obrasci mogu koristiti za referentnu kemikaliju i kontrolu toksičnosti.

6. **ANALIZA UGLJIKA**(fakultativno)

Analizator ugljika:

Vrijeme (dan)	Slijepa proba mg/l	Ispitivana kemikalija mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) Ili na kraju inkubacije.

▼B

$$\% \text{ opadanja DOC} - \text{a} := \left(\frac{1 - C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. **ABIOTIČKA RAZGRADNJA**(fakultativno)

$$\% \text{ abioičke razgradnje} = \frac{\text{tvorba } CO_2 \text{ u sterilnoj kontroli nakon 28 dana (mg)}}{ThCO_2 (\text{mg})} \times 100$$

V. DIO **MANOMETRIJSKO-RESPIROMETRIJSKI TEST**(metoda C.4.-D)

V.1. NAČELO METODE

Izmjereni volumen inokuliranog mineralnog medija koji sadrži poznatu koncentraciju ispitivane kemikalije (100 mg/l ispitivane tvari tako da se dobije najmanje 50 – 100 mg TPK/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljika miješa se u zatvorenoj tikvici na stalnoj temperaturi (± 1 °C ili manje) do najviše 28 dana. Potrošnja kisika određuje se mjerenjem količine kisika (dobivenog elektrolitički) koja je potrebna za održavanje stalnog volumena plina u respirometarskoj tikvici ili iz promjene volumena ili tlaka (ili jednog i drugog) u aparaturi. Nastali ugljikov dioksid apsorbira se u otopini kalijevog hidroksida ili drugom prikladnon apsorbensu. Količina kisika koju je potrošila ispitivana kemikalija (ispravljena za vrijednost slijepe probe inokuluma, koja se izvodi paralelno) izražava se kao postotak $ThCO_2$ ili KPK. Fakultativno se može izračunati i primarna biorazgradnja iz dopunske specifične analize učinjene na početku i kraju inkubacije te potpuna biorazgradnja analizom DOC-a.

V.2. OPIS METODE

V.2.1. **Aparatura**

(a) prikladan respirometar;

(b) termostat koji održava temperaturu na ± 1 °C ili bolji;

(c) uređaj za membransku filtraciju (fakultativno);

(d) analizator ugljika (fakultativno).

V.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Za pripremu radnih otopina vidjeti I.6.2.

Pomiješa se 10 ml otopine (a) s 800 ml vode za razrjeđivanje, doda 1 ml otopina (b) do (d) i nadopuni vodom za razrjeđivanje do 1 l.

V.2.3. **Priprema i prethodno kondicioniranje inokuluma**

Inokulum se može dobiti iz različitih izvora: aktivni mulj, otpadne vode, površinske vode i tla ili iz kombinacije tih izvora.

Vidjeti I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

V.2.4. **Priprema tikvica**

Iz radnih otopina se odvojeno pripreme otopine ispitivane i referentne kemikalije u mineralnom mediju, u pravilu u koncentraciji od 100 mg kemikalije po litri (tako da se dobije najmanje 50 – 100 mg TPK/l).

▼B

TPK se izračunava na temelju tvorbe amonijevih soli, osim ako se očekuje nitrifikacija, u kom se slučaju izračun temelji na tvorbi nitrata (vidjeti Dodatak 2.2.).

Odrede se pH vrijednosti i prema potrebi podese na 7,4 ± 0,2.

Slabo topljive tvari treba dodati u kasnijoj fazi (vidjeti u nastavku).

Ako treba odrediti toksičnost ispitivane kemikalije, pripremi se još jedna otopina u mineralnom mediju koja sadrži istu koncentraciju ispitivane i referentne kemikalije kao pojedinačne otopine.

Ako je potrebno mjerenje fizikalno-kemijske potrošnje kisika, pripremi se otopina ispitivane kemikalije, u pravilu u koncentraciji 100 mg TPK/l, sterilizirana dodavanjem prikladne toksične tvari (vidjeti I.6.6.).

Potrebne količine otopine ispitivane i referentne kemikalije uvode se u najmanje po dvije paralelne tikvice. Osim toga, treba pripremiti tikvice koje sadrže samo mineralni medij (za kontrolu inokuluma) te, prema potrebi, miješanu otopinu ispitivane i referentne kemikalije i sterilnu otopinu.

Ako je ispitivana kemikalija slabo topljiva, ona se u ovoj fazi dodaje izravno na bazi mase ili volumena ili se s njom postupa kako je opisano u Dodatku 3. U odjeljke apsorbera CO_2 stavi se kalijev hidroksid, pelete natronskog vapna ili drugi apsorbens.

V.2.5. **Broj tikvica u tipičnom ispitivanju**

Tikvica 1 i 2: ispitna suspenzija

Tikvica 3 i 4: slijepa proba inokuluma

Tikvica 5: kontrola postupka

po mogućnosti odnosno prema potrebi:

Tikvica 6: sterilna kontrola

Tikvica 7: kontrola toksičnosti

Vidjeti također I.6.7.

V.2.6. **Provođenje ispitivanja**

Kada se postigne željena temperatura, posude se inokuliraju pripremljenim aktivnim muljem ili drugim izvorom inokuluma da se dobije koncentracija suspendirane krute tvari do najviše 30 mg/l. Sastavi se oprema, pokrene mješač i provjeri zrakonepropusnost te započne s mjerenjem potrošnje kisika. Nakon toga je obično dovoljno obavljati redovita očitavanja i svakodnevno nadzirati temperaturu i miješanje.

Potrošnja kisika izračunava se iz vrijednosti koje se očitavaju u učestalim i redovitim razmacima metodama koje navodi proizvođač opreme. Na kraju inkubacije, u pravilu 28 dana, izmjeri se pH sadržaja tikvica, posebno ako je potrošnja kisika niska ili viša od $TPKNH_4$ (kod spojeva koji sadrže dušik).

▼B

Ako je to potrebno, na početku i na kraju se iz respirometarskih tikvica uzmu uzorci za analizu DOC-a ili specifičnu kemijsku analizu (vidjeti Dodatak 2.4.). Kod početnog uzimanja uzorka treba voditi računa da u tikvici ostane poznati volumen ispitne suspenzije. Ako kisik troši ispitivana tvar koja sadrži dušik, odredi se povećanje koncentracije nitrita i nitrata u razdoblju od 28 dana i napravi ispravak za kisik potrošen nitrifikacijom (Dodatak 5.).

V.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

V.3.1. **Obrada rezultata**

Potrošnja kisika (mg) ispitivane kemikalije nakon određenog vremena (ispravljena za vrijednost slijepe probe inokuluma nakon istog vremena) podijeli se s upotrijebljenom masom ispitivane kemikalije. Tako se dobije BPK izražen u mg kisika po mg ispitivane kemikalije tj.:

$$\text{BPK} = \frac{(\text{mg potrošnja } O_2 \text{ ispitivane kemikalije} - \text{mg potrošnja } O_2 \text{ slijepe probe})}{(\text{mg ispitivane kemikalije u tikvici})}$$

= mg O_2 po mg ispitivane kemikalije

izračuna se postotak biorazgradnje kao:

$$\%\ \text{biodegradare} = \%\ \text{TPK} = \frac{\%\ \text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalije})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalije})} \times 100$$

ili

$$\%\ \text{KPK} = \frac{\%\ \text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalije})}{\text{KPK}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalije})} \times 100$$

Valja napomenuti da ove dvije metode ne daju nužno isti rezultat; prednost se daje prvoj metodi.

Kod ispitivanih tvari koje sadrže dušik treba koristiti odgovarajući TPK (NH_4 ili NO_3), ovisno o tomu da li se očekuje pojava nitrifikacije (Dodatak 2.2.). Ako je došlo do nepotpune nitrifikacije, izračuna se ispravak za kisik potrošen nitrifikacijom iz promjene koncentracije nitrita i nitrata (Dodatak 5.).

Ako se provode fakultativna određivanja organskog ugljika i/ili specifična kemijska analiza, postotak razgradnje izračunava se kako je opisano u I.7.

Sve rezultate treba upisati u priložene obrasce za dostavu podataka.

V.3.2. **Valjanost rezultata**

Potrošnja kisika slijepe probe inokuluma u pravilu iznosi 20 – 30 mg O_2/l i ne bi smjela biti viša od 60 mg/l u 28 dana. Kod vrijednosti iznad 60 mg/l potrebno je kritički preispitati podatke i pokusne tehnike. Ako je pH vrijednost izvan područja 6 – 8,5 i ako je potrošnja kisika ispitivane kemikalije manja od 60 %, ispitivanje treba ponoviti s nižom koncentracijom ispitivane kemikalije.

Vidjeti također I.5.2.

▼B

V.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

V.4. **OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA**

Primjer obrasca za dostavu podataka nalazi se u nastavku.

MANOMETRIJSKO-RESPIROMETRIJSKI TEST

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: … mg/l

Početna koncentracija u mediju, C_o: … mg/l

Volumen u ispitnoj tikvici (V): … ml

TPK ili KPK: … mg O_2/mg ispitivane tvari (NH_4 ili NO_3)

4. **INOKULUM**

Izvor:

Obrada:

Prethodno kondicioniranje, ako se provodi:

Koncentracija suspendirane krute tvari u reakcijskoj smjesi: … mg/l

5. **POTROŠNJA KISIKA: BIORAZGRADIVOST**

		Vrijeme (dani)											
		0		7		14			21			28	
Potrošnja O_2 (mg) ispitivna kemikalija	1												
	2												
	a, srednja vrijednost												
Potrošnja O_2 (mg) slijepa proba	3												
	4												
	b, srednja vrijednost												
Ispravljeni BPK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BPK po mg ispitivane kemikalije	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Vrijeme (dani)											
		0		7		14			21			28	
% razgradnje $\frac{BPK}{TPK} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Srednja vrijednost (*)												

V = volumen medija u ispitnoj tikvici
(*) D_1 i D_2 se ne uprosječuju ako se vrijednosti znatno razlikuju.

Napomena: Slični se obrasci mogu koristiti za referentnu kemikaliju i kontrolu toksičnosti.

6. **ISPRAVAK ZA NITRIFIKACIJU**(vidjeti Prilog V.)

Dan		0	28	Razlika
i.	Koncentracija nitrata (mg N/l)			(N)
ii.	Ekvivalent kisika (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii.	Koncentracija nitrita (mg N/l)			(N)
iv.	Ekvivalent kisika (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii. + iv.)	Ukupni ekvivalent kisika	—	—	

7. **ANALIZA UGLJIKA**(fakultativno)

Analizator ugljika:

Vrijeme (dan)	Slijepa proba mg/l	Ispitivana kemikalija mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Ili na kraju inkubacije.

$$\% \text{ COD eliminat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA**(fakultativno)

S_b = koncentracija u fizikalno-kemijskoj (sterilnoj) kontroli nakon 28 dana

S_a = koncentracija u inokuliranoj tikvici nakon 28 dana

$$\% \text{ biorazgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTIČKA RAZGRADNJA**(fakultativno)

a = potrošnja kisika u sterilnim tikvicama nakon 28 dana, (mg)

$$\text{potrošnja kisika po mg ispitivane kemikalije} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(vidjeti odjeljke 1. i 3.)

$$\% \text{ abiotičke razgradnje} = \frac{a \times 100}{C_o V \times TPK}$$

DIO VI. **TEST SA ZATVORENIM BOCAMA**(metoda C.4.-E)

VI.1. NAČELO ISPITNE METODE

Otopina ispitivane kemikalije u mineralnom mediju, obično 2 – 5 mg/l, inokulira se relativno malim brojem mikroorganizama iz miješane populacije i drži u potpuno napunjenim zatvorenim bocama u mraku na stalnoj temperaturi. Razgradnja se prati putem analize otopljenog kisika tijekom razdoblja od 28 dana. Potrošnja kisika ispitivane kemikalije, ispravljena za potrošnju kisika paralelne slijepe probe inokuluma, izražava se kao postotak TPK ili KPK.

VI.2. OPIS METODE

VI.2.1. **Aparatura**

(a) boce BPK sa staklenim čepovima, npr. 250 – 300 ml;

(b) vodena kupelj ili inkubator za držanje boca na stalnoj temperaturi (± 1 °C ili bolji) bez pristupa svjetlosti;

(c) velike staklene boce (2 – 5 litara) za pripremu medija i punjenje boca BPK;

(d) kisikova elektroda i mjerač kisika odnosno oprema i reagensi za Winklerovu titraciju.

VI.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Za pripremu radnih otopina vidjeti I.6.2.

Promiješa se 1 (jedan) ml otopine (a) do (d) i nadopuni vodom za razrjeđivanje do 1 litre.

VI.2.3. **Priprema inokuluma**

Inokulum se u pravilu dobiva iz sekundarne otpadne vode postrojenja za pročišćavanje ili laboratorijske jedinice u koju pretežito ulaze komunalne otpadne vode. Drugi mogući izvor inokuluma je površinska voda. Uglavnom se koristi jedna kap (0,05 ml) do 5 ml filtrata po litri medija; ponekad je potrebno izvesti pokuse kako bi se utvrdio optimalni volumen za pojedinu otpadnu vodu (vidjeti I.6.4.2. i I.6.5.).

VI.2.4. **Priprema tikvica**

Mineralni medij se intenzivno dozračuje najmanje 20 min. Svaki niz ispitivanja treba provesti s mineralnim medijem iz iste šarže. Općenito, medij je spreman za uporabu nakon što odstoji 20 sati na ispitnoj temperaturi. Odredi se koncentracija otopljenog kisika u svrhu kontrole; vrijednost bi trebala biti oko 9 mg/l na 20 °C. U svim postupcima prijenosa i punjenja zrakom zasićenog medija treba izbjeći stvaranje mjehurića, na primjer uporabom sifona.

▼B

Pripreme se paralelne skupine boca BPK za određivanje BPK ispitivane i referentne kemikalije u simultanim pokusnim nizovima. Postavi se dovoljan broj boca BPK, uključujući slijepe probe inokuluma, kako bi se u željenim vremenskim razmacima, npr. nakon 0, 7, 14, 21 i 28 dana, mogla obaviti najmanje dvostruka mjerenja potrošnje kisika. Ponekad je za utvrđivanje roka od 10 dana potrebno i više boca.

Potpuno dozračeni mineralni medij ulije se u velike boce tako da ispuni oko 1/3 njihove zapremnine. Zatim se u boce doda dovoljna količina radne otopine ispitivane ili referentne kemikalije tako da konačna koncentracija kemikalija uglavnom ne bude viša od 10 mg/l. Kemikalije se ne dodaju u veliku bocu s medijem koji služi kao slijepa proba.

Koncentracija otopljenog kisika u bocama BPK ne smije pasti ispod 0,5 mg/l kako se ne bi ograničila aktivnost inokuluma. Time je koncentracija ispitivane kemikalije ograničena na otprilike 2 mg/l. Ipak, kod slabo razgradivih spojeva i spojeva s niskim TPK može se upotrijebiti i 5 – 10 mg/l. U određenim je slučajevima preporučljivo provesti paralelna ispitivanja s dvije različite koncentracije ispitivane kemikalije, npr. 2 i 5 mg/l. TPK se u pravilu izračunava na temelju tvorbe amonijevih soli, s time da se u očekivanim odnosno poznatim slučajevima nitrifikacije izračun temelji na tvorbi nitrata (TPK_{NO3}: vidjeti Dodatak 2.2.). Ako nastupi nepotpuna nitrifikacija, treba učiniti ispravak za promjene koncentracije nitrita i nitrata utvrđene analizom (vidjeti Dodatak 5.).

Ako se ispituje toksičnost ispitivane kemikalije (npr. ako je prethodno utvrđena niska vrijednost biorazgradnje), potreban je još jedan niz boca.

Potrebno je pripremiti još jednu veliku bocu koja sadrži dozračeni mineralni medij (do oko jedne trećine zapremnine) s ispitivanom i referentnom kemikalijom, čija je konačna koncentracija u pravilu jednaka koncentraciji u drugim velikim bocama.

Otopine u velikim bocama inokuliraju se sekundarnom otpadnom vodom (jedna kap ili oko 0,05 ml do 5 ml/l) ili drugim izvorom, kao što je rječna voda (vidjeti I.6.4.2.). Otopine se na kraju nadopune dozračenim mineralnim medijem uz pomoć crijeva koje seže do dna boce kako bi se postiglo potrebno miješanje.

VI.2.5. **Broj boca u tipičnom ispitivanju**

U tipičnom se ispitivanju koriste sljedeće boce:

— najmanje 10 boca koje sadrže ispitivanu kemikaliju i inokulum (ispitna suspenzija),

— najmanje 10 boca koje sadrže samo inokulum (slijepa proba inokuluma),

— najmanje 10 boca koje sadrže referentnu kemikaliju i inokulum (kontrola postupka),

▼B

— prema potrebi, šest boca koje sadrže ispitivanu kemikaliju, referentnu kemikaliju i inokulum (kontrola toksičnosti). Ipak, ponekad je za određivanje roka od 10 dana potrebno otprilike dvostruko više boca.

VI.2.6. **Provođenje ispitivanja**

Pripremljene otopine se odmah pretoče u odgovarajuće skupine boca BPK pomoću crijeva iz donje četvrtine (ne dna) velikih boca, tako da sve boce BPK budu potpuno napunjene. Nježnim kvrckanjem po stijenki iz boca se uklone mogući mjehurići zraka. Boce se odmah analiziraju na otopljeni kisik u nultom vremenu Winklerovom metodom ili elektrodom. Sadržaj boca može se konzervirati za naknadnu analizu Winklerovom metodom dodavanjem mangan (II) sulfata i natrijevog hidroksida (prvi Winklerov reagens). Pažljivo začepljene boce, koje sadrže kisik fiksiran kao smeđi mangan (III) hidratizirani oksid, treba do nastavka Winklerovog postupka pohraniti u mraku na 10 – 20 °C do najviše 24 sata. Preostale paralelne boce se začepe, pazeći da u njima ne ostanu zarobljeni mjehurići zraka, i inkubiraju u mraku na 20 °C. Na svaki ispitni niz dolazi kompletan paralelni niz za određivanje vrijednosti slijepe probe inokuluma. Tijekom 28-dnevne inkubacije se iz svakog niza u određenim vremenskim razmacima (najmanje jedanput tjedno) uzimaju najmanje po dvije boce radi analize otopljenog kisika.

Tjedni uzorci omogućuju ocjenu postotka opadanja unutar roka od 14 dana, dok bi uzorkovanje svaka 3 do 4 dana trebalo omogućiti da se utvrdi rok od 10 dana, što zahtijeva otprilike dvostruko više boca.

Kod ispitivanih tvari koje sadrže dušik treba učiniti ispravak za potrošnju kisika uslijed nitrifikacije. Za to je potrebno odrediti koncentraciju otopljenog kisika uz pomoć kisikove elektrode i nakon tog uzeti uzorak iz boce BPK za analizu nitrita i nitrata. Potrošnja kisika izračunava se iz povećanja koncentracije nitrita i nitrata (vidjeti Prilog V.).

VI.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

VI.3.1. **Obrada rezultata**

Prvo se izračuna BPK nakon svakog vremenskog razdoblja oduzimanjem potrošnje kisika (mg O_2/l) slijepe probe inokuluma od potrošnje kisika ispitivane kemikalije. Ispravljena vrijednost potrošnje podijeli se koncentracijom (mg/l) ispitivane kemikalije da bi se dobio specifični BPK u mg kisika po mg ispitivane kemikalije. Postotak biorazgradivosti izračuna se tako da se specifični BPK podijeli specifičnim TPK (izračunan u skladu s Dodatkom 2.2.) ili KPK (određen analizom, vidjeti Dodatak 2.3.). Dakle:

$$\text{BPK} = \frac{(\text{mg potrošnja } O_2 \text{ ispitivane kemikalije} - \text{mg potrošnja } O_2 \text{ slijepe probe})}{(\text{mg ispitivane kemikalije u tikvici})}$$

▼B

= mg O_2 po mg ispitivane kemikalije

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg ispitvane tvari})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2/\text{mg ispitivane tvari})} \times 100$$

ili

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg ispitvane tvari})}{\text{KPK}(\text{mg } O_2/\text{mg ispitivane tvari})} \times 100$$

Valja napomenuti da ove dvije metode ne daju nužno isti rezultat; prednost se daje prvoj metodi.

Kod ispitivanih tvari koje sadrže dušik treba koristiti odgovarajući TPK (NH_4 ili NO_3), ovisno o tomu da li se očekuje pojava nitrifikacije (Dodatak 2.2.). Ako je došlo do nepotpune nitrifikacije, izračuna se ispravak za kisik potrošen nitrifikacijom iz promjene koncentracije nitrita i nitrata (Dodatak 5.).

VI.3.2. **Valjanost rezultata**

Potrošnja kisika u slijepoj probi inokuluma ne bi smjela biti viša od 1,5 mg otopljenog kisika po litri nakon 28 dana. Kod viših vrijednosti treba preispitati pokusne tehnike. Preostala koncentracija kisika u ispitnim bocama niti u jednom trenutku ne smije pasti ispod 0,5 mg/l. Tako niske koncentracije kisika dopuštene su samo ako se primjenjuje metoda određivanja otopljenog kisika kojom se mogu točno mjeriti takve vrijednosti.

Vidjeti također I.5.2.

VI.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

VI.4. OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

Primjer obrasca za dostavu podataka nalazi se u nastavku.

TEST SA ZATVORENIM BOCAMA

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: … mg/l

Početna koncentracija u boci: … mg/l

TPK ili KPK: … mg O_2/mg ispitivane tvari

4. **INOKULUM**

Izvor:

Obrada:

▼B

Prethodno kondicioniranje, ako se provodi:

Koncentracija u reakcijskoj smjesi: … mg/l

5. **ODREĐIVANJE DO**

Metoda: Winkler/elektroda

Analize tikvica

Vrijeme inkubacije (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Slijepa proba (bez kemikalije)	1	C_1				
	2	C_2				
Srednja vrijednost	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Ispitivana kemikalija	1	a_1				
	2	a_2				
Srednja vrijednost	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Napomena: Sličan obrazac se može koristiti za referentnu kemikaliju i kontrolu toksičnosti.

6. **ISPRAVAK ZA NITRIFIKACIJU**(vidjeti Prilog V.)

Vrijeme inkubacije (d)	0	n_1	n_2	n_3
i. Koncentracija nitrata (mg N/l)				
ii. Promjena koncentracije nitrata (mg N/l)	—			
iii. Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
iv. Koncentracija nitrita (mg N/l)				
v. Promjena koncentracije nitrita (mg N/l)	—			
vi. Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
(iii. + vi.) Ukupni ekvivalent kisika (mg/l)	—			

7. **POTROŠNJA DO: % RAZGRADNJE**

	Potrošnja nakon n dana (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
TIKVICA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
TIKVICA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Potrošnja nakon n dana (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
TIKVICA 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{ispitna konc.} \times \text{TPK kemikalije}}$				
TIKVICA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{ispitna konc.} \times \text{TPK kemikalije}}$				
% D srednja vrijednost (*) $= \frac{D_1 \cdot D_2}{2}$				

(*) Srednja se vrijednost ne primjenjuje u slučaju velikih razlika između ponavljanja.

m_{to} = vrijednost u tikvici u vremenu 0

m_{tx} = vrijednost u tikvici u vremenu x

m_{bo} = srednja vrijednost slijepe probe u vremenu 0

m_{bx} = srednja vrijednost slijepe probe u vremenu x

Treba primijeniti i ispravak za nitrifikaciju iz iii. + vi. u odjeljku 6.

8. **POTROŠNJA DO U SLIJEPOJ PROBI**

Potrošnja kisika slijepe probe: (m_{bo} – m_{b28}) mg/l. Ova je potrošnja važna za valjanost ispitivanja. Ona treba biti niža od 1,5 mg/l.

DIO VII. **TEST M.I.T.I.**(metoda C.4.-F)

VII.1. NAČELO METODE

Potrošnja kisika otopine ili suspenzije ispitivane kemikalije u mineralnom mediju, inokuliranom posebno uzgojenim neprilagođenim mikroorganizmima, mjeri se automatski tijekom 28 dana u zamračenom zatvorenom respirometru na 25 ± 1 °C, uz stalno miješanje. Nastali ugljikov dioksid apsorbira natronsko vapno. Biorazgradivost se izražava kao postotak potrošnje kisika (ispravljen za vrijednost slijepe probe) u odnosu na teoretsku potrošnju (TPK). Osim toga, postotak primarne biorazgradivosti izračunava se iz dopunske specifične kemijske analize učinjene na početku i kraju inkubacije te, fakultativno, analizom DOC-a.

VII.2. OPIS METODE

VII.2.1. **Aparatura**

(a) automatski elektrolitički mjerač BPK ili respirometar, u pravilu opremljen sa šest boca po 300 ml s čašama za apsorbens CO_2;

▼B

(b) prostor sa stalnom temperaturom i/ili vodena kupelj 25 ± 1 °C ili bolja;

(c) uređaj za membransku filtraciju (fakultativno);

(d) analizator ugljika (fakultativno).

VII.2.2. **Priprema mineralnog medija**

Pripreme se sljedeće radne otopine s analitički čistim reagensima i vodom (I.6.1.);

(a)	monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikalijev monohidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatrijev monohidrogen ortofosfat dodekahidrat Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	amonijev klorid, NH_4Cl	1,70 g
	Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.	
	pH vrijednost otopine treba biti 7,2.	
(b)	magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.	
(c)	kalcijev klorid bezvodni, $CaCl_2$	27,50 g
	Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.	
(d)	Željezo (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Otopiti u vodi i nadopuniti do 1 litre.	

Uzme se po 3 ml otopine (a), (b), (c) i (d) i nadopuni do 1 litre.

VII.2.3. **Priprema inokuluma**

Treba prikupiti svježe uzorke s najmanje deset mjesta, uglavnom s područja gdje se koriste i ispuštaju različite kemikalije. Uzmu se 1-litarski uzorci mulja, površinskog tla, vode itd. s mjesta kao što su postrojenja za pročišćavanje komunalnih i industrijskih otpadnih voda, rijeke, jezera, mora i sve zajedno dobro izmiješa. Nakon uklanjanja plutajućih čestica smjesa se pusti da odstoji i supernatat podesi na pH 7 ± 1 pomoću natrijevog hidroksida ili fosforne kiseline.

Posuda za aktivni mulj sa sistemom punjenja i pražnjenja napuni se odgovarajućom količinom filtriranog supernatata i tekućina dozračuje oko 23 ½ sata. 30 minuta nakon prekida dozračivanja baci se otprilike jedna trećina ukupnog volumena supernatanta i istaloženom materijalu doda isti volumen otopine (pH 7) koja sadrži po 0,1 % glukoze, peptona i monokalijevog ortofosfata te ponovno započne s dozračivanjem. Ovaj se postupak ponavlja jedanput dnevno. Uređajem za mulj treba upravljati u skladu s dobrom praksom: voda treba biti bistra, temperaturu treba održavati na 25 ± 2 °C, pH treba biti 7 ± 1, mulj se mora dobro taložiti, treba osigurati dostatno dozračivanje kako bi smjesa u svakom trenutku bila aerobna, trebaju biti prisutne praživotinje, aktivnost mulja treba provjeravati najmanje jedanput u tri mjeseca uz pomoć referentne tvari. Mulj se može koristiti kao inokulum tek nakon jednog mjeseca rada uređaja te najviše četiri mjeseca od početka rada. Nakon toga treba svaka tri mjeseca, u pravilnim razmacima, uzimati uzorke s najmanje 10 mjesta.

▼B

Da bi se svježi i stari mulj održali na istoj razini aktivnosti, filtrirani supernatant aktivnog mulja u uporabi pomiješa se s jednakim volumenom filtriranog supernatanta svježe prikupljene smjese iz deset izvora te se dobivena kombinirana tekućina uzgaja na način kako je opisano gore. Mulj se može upotrijebiti kao inokulum 18 – 24 sata nakon punjenja uređaja.

VII.2.4. **Priprema tikvica**

Pripremi se šest tikvica:

br. 1: ispitivana kemikalija u vodi za razrjeđivanje 100 mg/l

br. 2, 3 i 4: ispitivana kemikalija u mineralnom mediju 100 mg/l

br. 5: referentna kemikalija (npr. anilin) u mineralnom mediju 100 mg/l

br. 6: samo mineralni medij.

Ispitivane tvari koje su slabo topljive treba izravno dodati u tikvicu na bazi mase ili volumena ili s njima postupati kako je opisano u Dodatku 3., s time da se pritom ne smiju koristiti otapala niti emulgatori. Apsorbens CO_2 treba dodati u sve tikvice u čašama koje su za to posebno predviđene. pH u tikvicama br. 2, 3 i 4 treba podesiti na 7,0.

VII.2.5. **Provođenje ispitivanja**

Tikvice br. 2, 3 i 4 (ispitne suspenzije), br. 5 (kontrola aktivnosti) i br. 6 (slijepa proba inokuluma) inokuliraju se malom količinom inokuluma tako da se dobije koncentracija suspendirane krute tvari od 30 mg/l. Inokulum se ne dodaje u tikvicu br. 1, koja se koristi kao abiotička kontrola. Sastavi se oprema, provjeri zrakonepropusnost, pokrenu mješači i započne s mjerenjem potrošnje kisika u mraku. Temperaturu, mješač i kulometrijski detektor potrošnje kisika treba provjeravati svakodnevno te bilježiti sve promjene u boji sadržaja tikvica. Potrošnju kisika šest tikvica treba izravno očitavati prikladnom metodom, npr. s pisača sa 6 ulaza koji daje krivulju BPK. Na kraju inkubacije, u pravilu 28 dana, izmjeri se pH sadržaja tikvica i odredi koncentracija preostale ispitivane kemikalije i mogućih intermedijera te, u slučaju tvari topljivih u vodi, koncentracija DOC-a (Dodatak 2.4.). Kod hlapljivih je kemikalija nužan poseban oprez. Ako se očekuje nitrifikacija, odredi se koncentracija nitrata i nitrita, ako je to moguće.

VII.3. PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

VII.3.1. **Obrada rezultata**

Potrošnja kisika (mg) ispitivane kemikalije nakon određenog vremena, ispravljena za vrijednost slijepe probe inokuluma nakon istog vremena, podijeli se upotrijebljenom masom ispitivane kemikalije. Na taj se način dobije BPK izražen u mg kisika/mg ispitivane kemikalije tj.:

$$\text{BPK} = \frac{(\text{mg potrošnja } O_2 \text{ispitivane kemikalije} - \text{mg potrošnja } O_2 \text{slijepe probe})}{(\text{mg ispitivane kemikalije u tikvici})}$$

= mg O_2 po mg ispitivane kemikalije

▼B

Postotak biorazgradnje se zatim dobije kao:

$$\% \text{ biorazgradnje} = \% \text{ TPK} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalije})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalije})} \times 100$$

TPK za smjese izračunava se iz elementarne analize kao kod jednostavnih spojeva. Pritom se koristi odgovarajući TPK (TPK_{NH4} ili TPK_{NO3}), ovisno o tome je li nitrifikacija izostala ili je nastupila potpuna nitrifikacija (Dodatak 2.2.). Ako je došlo do nepotpune nitrifikacije, izračuna se ispravak za kisik potrošen nitrifikacijom iz promjene koncentracija nitrita i nitrata (Dodatak 5.).

Postotak primarne biorazgradnje izračunava se iz gubitka specifične (polazne) kemikalije (vidjeti I.7.2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Ako je u tikvici br. 1, u kojoj se mjeri fizikalno-kemijska razgradnja, došlo do gubitka ispitivane kemikalije, to treba navesti u izvješću i izračunati postotak biorazgradnje iz koncentracije ispitivane kemikalije (S_b) u ovoj tikvici nakon 28 dana.

Ako se određuje DOC (fakultativno), postotak potpune biorazgradnje izračunava se kao:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

kako je opisano u točki I.7.1. Ako je u tikvici br. 1, u kojoj se mjeri fizikalno-kemijska razgradnja, došlo do gubitka DOC-a, postotak biorazgradnje izračunava se iz koncentracije DOC-a u ovoj tikvici.

Sve rezultate treba upisati u priložene obrasce za dostavu podataka.

VII.3.2. **Valjanost rezultata**

Potrošnja kisika slijepe probe inokuluma u pravilu iznosi 20 – 30 mg O_2/l i ne bi smjela biti viša od 60 mg/l u 28 dana. Kod vrijednosti iznad 60 mg/l treba kritički preispitati podatke i pokusne tehnike. Ako je pH vrijednost izvan područja 6 – 8,5 i ako je potrošnja kisika ispitivane kemikalije manja od 60 %, ispitivanje treba ponoviti s nižom koncentracijom ispitivane kemikalije.

Vidjeti također I.5.2.

Ispitivanje nije valjano ako postotak razgradnje anilina izračunan iz potrošnje kisika nije viši od 40 % nakon 7 dana i nije viši od 65 % nakon 14 dana.

VII.3.3. **Izvješćivanje**

Vidjeti I.8.

VII.4. OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

Primjer obrasca nalazi se u nastavku.

TEST MITI (I)

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA**

▼B

3. **ISPITIVANA TVAR**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: mg/l kao kemikalija

Početna koncentracija u mediju, C_o: … mg/l kao kemikalija

Volumen reakcijske smjese, V: … ml

TPK: … mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Mjesta uzorkovanja:

(1) … (6) …

(2) … (7) …

(3) … (8) …

(4) … (9) …

(5) … (10) …

Koncentracija suspendirane krute tvari u aktivnom mulju nakon aklimatizacije sa sintetičkom otpadnom vodom = … mg/l

Volumen aktivnog mulja po litri konačnog medija = … ml

Koncentracija mulja u konačnom mediju = … mg/l

5. **POTROŠNJA KISIKA: BIORAZGRADIVOST**

Vrsta respirometra:

			Vrijeme (dani)				
			0	7	14	21	28
Potrošnja O_2 (mg) ispitivana kemikalija	a_1						
	a_2						
	a_3						
Potrošnja O_2 (mg) slijepa proba	b						
Ispravljeni BPK (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BPK po mg ispitivane kemikalije	$\frac{a - b}{C_o V}$	Tikvica 1					
		Tikvica 2					
		Tikvica 3					
% razgradnje $\frac{BPK}{TPK} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Srednja vrijednost (*)					

(*) Srednja vrijednost ne primjenjuje se u slučaju velikih razlika između ponavljanja.

▼B

Napomena: Slični obrasci se mogu koristiti za referentni spoj.

6. **ANALIZA UGLJIKA**(fakultativno)

Analizator ugljika:

Tikvica	DOC				% opadanja DOC-a	Srednja vrijednost
	Izmjereni		Ispravljeni			
Voda + ispitivana tvar	a				—	—
Mulj + ispitivana tvar	b_1		$b_1 - c$			
Mulj + ispitivana tvar	b_2		$b_2 - c$			
Mulj + ispitivana tvar	b_3		$b_3 - c$			
Slijepa proba	c		—		—	—

$$\% \text{ opadanja DOC} - a := \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **PODACI IZ SPECIFIČNE KEMIJSKE ANALIZE**

	Preostala količina ispitivane kemikalije na kraju ispitivanja	% razgradnje
slijepa proba s vodom	S_b	
inokulirani medij	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Izračuna se % razgradnje za tikvicu a_1 odnosno a_3.

8. **NAPOMENE**

Treba priložiti krivulju BPK u ovisnosti o vremenu, ako je raspoloživa.

▼B

Dodatak 1.

SKRAĆENICE I DEFINICIJE

DO (Dissolved Oxygen):	Xotopljeni kisik (mg/l) – koncentracija kisika otopljenog u vodenom uzorku.
BPK:	biokemijska potrošnja kisika (g) – količina kisika koju potroše mikroorganizmi za razgradnju ispitivanog spoja; izražava se i kao g potrošnje kisika po g ispitivanog spoja (vidjeti metodu C.5.).
KPK:	kemijska potrošnja kisika (g) – količina kisika koja se potroši za vrijeme oksidacije ispitivanog spoja vrućim kiselim dikromatom; ona predstavlja mjeru prisutne količine oksidativne tvari; izražava se i kao g potrošenog kisika po g ispitivanog spoja (vidjeti metodu C.6.).
DOC (Dissolved Organic Carbon):	otopljeni organski ugljik – organski ugljik koji je prisutan u otopini odnosno koji prolazi kroz 0,45-mikrometarski filtar ili ostaje u supernatantu nakon 15-minutnog centrifugiranja na 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).
TPK:	Teoretska potrošnja kisika (mg) – ukupna količina kisika potrebna za potpunu oksidaciju kemikalije; izračunava se iz molekulske formule (vidjeti Dodatak 2.2.) i izražava se i kao mg potrebnog kisika po mg ispitivanog spoja.
$ThCO_2$ (Theoretical Carbon Dioxide):	teoretski ugljikov dioksid (mg) – izračunana količina ugljikovog dioksida koja se dobije iz poznatog ili izmjerenog sadržaja ugljika ispitivanog spoja kod potpune mineralizacije; izražava se i kao mg razvijenog ugljikovog dioksida po mg ispitivanog spoja.
TOC (Total Organic Carbon):	ukupni organski ugljik – ukupni organski ugljik uzorka je zbroj organskog ugljika u otopini i suspenziji.
IC (Inorganic Carbon):	anorganski ugljik.
TC (Total Carbon):	ukupni ugljik – zbroj organskog i anorganskog ugljika u uzorku.

Primarna biorazgradnja:

promjena kemijske strukture tvari nastala uslijed biološkog djelovanja, koja dovodi do gubitka određenog svojstva tvari.

Potpuna biorazgradnja (aerobna):

stupanj razgradnje koji se postigne kad mikroorganizmi u cijelosti potroše ispitivani spoj, pri čemu nastaje ugljikov dioksid, voda, mineralne soli i novi mikrobni stanični sastojci (biomasa).

Lako biorazgradiv:

proizvoljno razvrstavanje kemikalija koje su prošle utvrđene testove pretraživanja na potpunu biorazradivost; ti su testovi toliko strogi da se može pretpostaviti da će se ti spojevi brzo i potpuno biološki razgraditi u vodnom okolišu u aerobnim uvjetima.

▼B

Kojemu je svojstvena biorazgradnja:

razvrstavanje kemikalija čija je biorazgradnja (primarna ili potpuna) nedvojbeno dokazana bilo kojim priznatim testom biorazgradivosti.

Pročistivost:

svojstvo koje pokazuju spojevi koji se daju ukloniti tijekom biološkog pročišćavanja otpadnih voda bez štetnog utjecaja na uobičajeni tijek postupaka pročišćavanja. Općenito, lako biorazgradivi spojevi su pročistivi, ali to ne vrijedi za sve spojeve kojima je svojstvena biorazgradnja. Ovdje mogu djelovati i abiotički procesi.

Vrijeme prilagodbe („lag” faza):

kod testa opadanja, vrijeme od inokulacije do trenutka kad postotak razgradnje dosegne najmanje 10 %. Vrijeme prilagodbe je često jako promjenljivo i slabo obnovljivo.

Vrijeme razgradnje:

vrijeme od kraja vremena prilagodbe do trenutka kad se dosegne 90 % maksimalnog stupnja razgradnje.

Rok od 10 dana:

deset dana neposredno nakon što se postigne 10 %-tna razgradnja.

▼B

Dodatak 2.

IZRAČUNAVANJE I ODREĐIVANJE PRIKLADNIH ZBIRNIH PARAMETARA

Potrebni su određeni zbirni parametri, ovisno o odabranoj metodi. U nastavku je opisano kako se izvode te vrijednosti. Korištenje parametara opisano je u okviru pojedinih metoda.

1. **Sadržaj ugljika**

Sadržaj ugljika izračunava se iz poznatog sastava elemenata ili se određuje elementarnom analizom ispitivane tvari.

2. **Teoretska potrošnja kisika (TPK)**

Teoretska potrošnja kisika (TPK) može se izračunati, ako je poznat sastav elemenata, ili odrediti elementarnom analizom. Ona je za spoj:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikacije

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} mg/mg$$

ili s nitrifikacijom

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} mg/mg$$

3. **Kemijska potrošnja kisika (KPK)**

Kemijska potrošnja kisika (KPK) određuje se u skladu s metodom C.6.

4. **Otopljeni organski ugljik (DOC)**

Otopljeni organski ugljik (DOC) je prema definiciji organski ugljik bilo koje kemikalije ili smjese u vodi koji prolazi kroz 0,45-mikrometarski filtar.

Uzmu se uzorci iz ispitnih posuda i odmah filtriraju u uređaju za filtraciju uz primjenu odgovarajućeg membranskog filtra. Prvih 20 ml (količina se može smanjiti ako se koriste mali filtri) filtrata se baca. Količine od 10 – 20 ml ili manje, u slučaju ubrizgavanja (volumen ovisi o količini potrebnoj za analizator ugljika), zadržavaju se za analizu ugljika. Koncentracija DOC-a određuje se pomoću analizatora organskog ugljika koji točno mjeri koncentraciju ugljika jednaku ili manju od 10 % početne koncentracije DOC-a koja se koristi u ispitivanju.

Filtrirani uzorci koji se ne mogu analizirati isti radni dan mogu se 48 sati čuvati u hladnjaku na 2 – 4 °C ili ispod – 18 °C u dužem vremenu.

Napomene:

Membranski se filtri često impregniraju površinski aktivnim tvarima kako bi se učinili hidrofilnima. Stoga filtar može sadržavati do nekoliko mg topljivog organskog ugljika koji može ometati određivanje biorazgradivosti. Površinski aktivne tvari i drugi topljivi organski spojevi uklanjaju se iz filtra iskuhavanjem u deioniziranoj vodi tri puta po jedan sat. Filtri se zatim mogu pohraniti u vodi jedan tjedan. Ako se koriste jednokratni filtarski ulošci, kod svake se serije treba uvjeriti da ulošci ne otpuštaju topljivi organski ugljik.

▼B

Kod nekih vrsta membranskih filtra može doći do adsorpcije ispitivane kemikalije. Stoga je preporučljivo uvjeriti se da se ispitivana kemikalija ne zadržava na filtru.

Za razlikovanje TOC-a od DOC-a se umjesto filtriranja može koristiti 15-minutno centrifugiranje na 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g). Ova metoda nije pouzdana kod početne koncentracije od < 10 mg DOC/l jer se tada ne uklone sve bakterije ili se ugljik ponovno otopi kao dio bakterijske plazme.

BIBLIOGRAFIJA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

Dodatak 3.

OCJENJIVANJE BIORAZGRADIVOSTI SLABO TOPLJIVIH TVARI

Kod ispitivanja biorazgradivosti slabo topljivih tvari posebnu pozornost treba obratiti na sljedeće aspekte.

Dok se kod uzorkovanja homogenih tekućina rijetko javljaju problemi, kod krutih se tvari preporučuje homogenizacija odgovarajućim sredstvima kako bi se izbjegle greške zbog nehomogenosti. Posebno treba paziti kad su potrebni reprezentativni uzorci od nekoliko miligrama iz smjesa kemikalija ili tvari s velikim količinama nečistoća.

Tijekom ispitivanja mogu se koristiti različiti oblici miješanja. Važno je miješati samo onoliko koliko je potrebno da kemikalija ostane dispergirana te izbjegavati pregrijavanje, pretjerano pjenjenje i pretjerane smične sile.

Može se koristiti emulgator koji tvori stabilnu disperziju kemikalije. On ne smije biti toksičan za bakterije i ne smije se biološki razgraditi niti izazivati pjenjenje u ispitnim uvjetima.

Za otapala vrijede isti kriteriji kao za emulgatore.

Kod krutih se tvari ne preporučuje uporaba krutih nosača, iako oni mogu biti prikladni za uljaste tvari.

Ako se koriste pomoćne tvari, kao što su emulgatori, otapala i nosači, treba izvesti slijepu probu s pomoćnom tvari.

Kod istraživanja biorazgradivosti slabo topljivih spojeva može se koristiti bilo koji od tri respirometrijska testa: CO_2, BPK ili MITI.

LITERATURA

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P, The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

Dodatak 4.

OCJENJIVANJE BIORAZGRADIVOSTI KEMIKALIJA ZA KOJE SE SUMNJA DA SU TOKSIČNE ZA INOKULUM

Ako se kemikalija podvrgne ispitivanju na laku biorazgradivost i čini se da nije biorazgradiva, preporučuje se da se provede sljedeći postupak, ako se želi utvrditi razlika između inhibicije i inertnosti (Reynolds i sur., 1987.).

Kod toksikoloških testova i testova biorazgradnje treba koristiti slične ili istovjetne inokulume.

Čini se da je za ocjenjivanje toksičnosti kemikalija koje se ispituju na laku biorazgradivost primjereno koristiti jednu od sljedećih metoda: test inhibicije disanja aktivnog mulja – Direktiva 87/302/EEZ, BPK ili test inhibicije rasta ili kombinaciju tih metoda.

Da bi se izbjegla inhibicija zbog toksičnosti, predlaže se da se kod ispitivanja lake biorazgradivosti koriste koncentracije ispitivane tvari ispod 1/10 vrijednosti EC_{50} (odnosno manje od vrijednosti EC_{20}) dobivenih kod toksikoloških ispitivanja. Spojevi čija je vrijednost EC_{50} viša od 300 mg/l ne bi trebali imati toksične učinke kod ispitivanja lake biorazgradivosti.

Vrijednosti EC_{50} ispod 20 mg/l mogu stvarati ozbiljne probleme u kasnijem tijeku ispitivanja. Treba koristiti niske ispitne koncentracije, koje zahtijevaju primjenu strogog i osjetljivog testa sa zatvorenim bocama ili korištenje ^{14}C obilježenog materijala. Aklimatizirani inokulum pruža mogućnost korištenja viših koncentracija ispitivane tvari. Ipak, u ovom posljednjem slučaju gubi se specifični kriterij lake biorazgradivosti.

BIBLIOGRAFIJA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

Dodatak 5.

ISPRAVAK ZA POTROŠNJU KISIKA ZBOG UTJECAJA NITRIFIKACIJE

Ako se kod ocjenjivanja biorazgradivosti na temelju potrošnje kisika ne uzme u obzir nitrifikacija, kod ispitivanih tvari koje ne sadrže kisik nastat će tek zanemarive greške (ne više od 5 %), čak i ako je oksidacija amonijskog dušika u mediju ispitnih posuda i posuda slijepe probe nepredvidiva. Međutim, ako ispitivana tvar sadrži dušik, mogu nastati ozbiljne greške.

Ako je došlo do nepotpune nitrifikacije, utvrđena potrošnja kisika reakcijske smjese može se ispraviti za količinu kisika koja je upotrijebljena pri oksidaciji amonijaka u nitrit i nitrat, ako se promjene koncentracije nitrita i nitrata tijekom inkubacije određuju pomoću sljedećih jednadžbi:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Ukupno:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Iz jednadžbe (1) proizlazi da potrošnja kisika kod oksidacije 28 g dušika iz amonijevog klorida (NH_4Cl) u nitrit iznosi 96 g, što odgovara faktoru 3,43 (96/28). Isto tako, iz jednadžbe (3) proizlazi da je potrošnja kisika kod oksidacije 28 g dušika u nitrat 128 g tj. faktor je 4,57 (128/28).

Budući da se radi o slijedu reakcija koje provode različite vrste bakterija, koncentracija nitrita može se povećati ili smanjiti; u ovom posljednjem slučaju nastala bi ekvivalentna koncentracija nitrata. Prema tomu, kisik potrošen u tvorbi nitrata iznosi 4,57 puta povećanje koncentracije nitrata, dok je kisik povezan s tvorbom nitrita 3,43 puta povećanje koncentracije nitrita ili, u slučaju smanjenja koncentracije, gubitak kisika je – 3,43 puta smanjenje koncentracije.

To jest:

O_2 potrošen u tvorbi nitrata = 4,57 × povećanje koncentracije nitrata (4)

i

O_2 potrošen u tvorbi nitrata = 3,43 × povećanje koncentracije nitrita (5)

i

O_2 izgubljen s nestankom nitrita = – 3,43 × smanjenje koncentracije nitrata (6)

tako da je

potrošnja O_2 uslijed nitrifikacije = ± 3,43 × promjena konc. nitrita + 4,57 × povećanje konc. nitrata (7)

i prema tomu

potrošnja O_2 uslijed oksidacije C = ukupna utvrđena potrošnja – potrošnja uslijed nitrifikacije (8).

Ako se umjesto toga određuje samo ukupni oksidirani N, može se uzeti da je potrošnja kisika uslijed nitrifikacije, kao prva aproksimacija, 4,57 × povećanje oksidiranog N.

Vrijednost ispravljena za potrošnju kisika uslijed oksidacije C se zatim uspoređuje s TPK NH_3 izračunanim u skladu s Dodatkom 2.

▼B

C.5. **RAZGRADNJA – BIOKEMIJSKA POTROŠNJA KISIKA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Svrha metode je mjerenje biokemijske potrošnje kisika (BPK) krutih i tekućih organskih tvari.

Podaci koji se dobivaju ovim testom vrijede za spojeve topljive u vodi; ipak, mogu se, barem načelno, ispitivati i hlapljivi spojevi i spojevi koji su slabo topljivi u vodi.

Metoda je primjenljiva samo kod organskih tvari koje u koncentraciji koja se koristi u ispitivanju nemaju inhibitorni učinak na bakterije. Ako ispitivana tvar nije topljiva u ispitnoj koncentraciji, ponekad je potrebno primijeniti posebne mjere, kao što je ultrazvučno raspršivanje, kako bi se postigla dobra disperzija ispitivane tvari.

Informacije o toksičnosti kemikalije mogu biti korisne za tumačenje niskih vrijednosti i odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija.

1.2. DEFINICIJA I JEDINICE

BPK je definiran kao masa otopljenog kisika koja je potrebna za biokemijsku oksidaciju određenog volumena otopine tvari u propisanim uvjetima.

Rezultati se izražavaju u gramima BPK po gramu ispitivane tvari.

1.3. REFERENTNE TVARI

Poželjno je koristiti prikladnu referentnu tvar za provjeru aktivnosti inokuluma.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Unaprijed određena količina tvari, otopljena ili dispergirana u dobro dozračenom prikladnom mediju, inokulira se mikroorganizmima i inkubira u mraku na definiranoj stalnoj temperaturi okolnog zraka.

BPK se određuje na temelju razlike između sadržaja otopljenog kisika na početku i kraju ispitivanja. Ispitivanje traje najmanje 5 i najviše 28 dana.

Paralelno treba izvesti slijepu probu bez ispitivane tvari.

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

Određivanje BPK ne može se smatrati valjanim određivanjem biorazgradivosti tvari. Ovaj se test može smatrati tek testom pretraživanja.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

Pripremi se preliminarna otopina ili disperzija tvari tako da se dobije koncentracija BPK u skladu s metodom koja se primjenjuje. BPK se zatim odredi pomoću bilo koje prikladne nacionalne ili međunarodne normirane metode.

▼B

2. **PODACI I VREDNOVANJE**

BPK sadržan u preliminarnoj otopini izračunava se u skladu s odabranom standardnom metodom i pretvara u grame BPK po gramu ispitivane tvari.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

Treba navesti primijenjenu metodu.

Biokemijska potrošnja kisika predstavlja srednju vrijednost najmanje tri valjana mjerenja.

Potrebno je navesti sve podatke i napomene bitne za tumačenje rezultata, posebno u pogledu nečistoća, fizikalnog stanja, toksičnih učinaka i svojstvenog sastava tvari koji mogu utjecati na rezultate.

Ako se koristi dodatak za inhibiciju biološke nitrifikacije, to također treba navesti.

4. **REFERENCE**

Popis normiranih metoda, npr.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **RAZGRADNJA – KEMIJSKA POTROŠNJA KISIKA**

1. **METODA**

1.1. UVOD

Svrha metode je mjerenje kemijske potrošnje kisika (KPK) krutih i tekućih organskih tvari na standardni proizvoljan način u definiranim laboratorijskim uvjetima.

Za provedbu ovog testa i tumačenje dobivenih rezultata korisno je imati podatke o formuli tvari (npr. halogene soli, željezove soli organskih spojeva, organoklorovi spojevi).

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Kemijska potrošnja kisika je mjera oksidativnosti tvari, izražena kao ekvivalentna količina kisika iz oksidirajućeg reagensa koju potroši tvar u definiranim laboratorijskim uvjetima.

Rezultat se izražava u gramima KPK po gramu ispitivane tvari.

1.3. REFERENTNE TVARI

Kod ispitivanja novih tvari nije uvijek potrebno koristiti referentne tvari. One prvenstveno služe za povremeno baždarenje metode i trebaju omogućiti usporedbu rezultata kod primjene neke druge metode.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Unaprijed određena količina tvari, otopljena ili dispergirana u vodi, oksidira se kalijevim dikromatom u jakom mediju sumporne kiseline pod refluksom uz primjenu srebrovog sulfata kao katalizatora u trajanju od dva sata. Preostali dikromat određuje se titracijom sa standardiziranim željezovim amonijevim sulfatom.

U slučaju tvari koje sadrže klor dodaje se živin sulfat ([1]) kako bi se smanjo utjecaj klora.

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

Zbog proizvoljnog načina određivanja KPK je „pokazatelj oksidativnosti” te se kao takav koristi kao praktična metoda mjerenja organske tvari.

Kloridi mogu ometati ovo ispitivanje; anorganska redukcijska i oksidacijska sredstva mogu također ometati određivanje KPK.

Neki ciklički spojevi i mnoge hlapljive tvari (npr. niže masne kiseline) ne oksidiraju se u potpunosti u ovom testu.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

Pripremi se preliminarna otopina ili disperzija tvari tako da se dobije KPK između 250 i 600 mg po litri.

([1]) Otopine koje sadrže živine soli treba nakon uporabe obraditi kako bi se izbjeglo oslobađanje žive u okoliš.

▼B

Napomene:

U slučaju slabo topljivih i nedisperzivnih tvari može se izvagati određena količina fine praškaste ili tekuće tvari koja otprilike odgovara 5 mg KPK i staviti u pokusnu aparaturu s vodom.

Kemijska potrošnja kisika (KPK) često se određuje pomoću inačice metode tj. u zatvorenom sustavu s izjednačavanjem tlaka (H. Kelkenberg, 1975.), koja je posebno korisna kod slabo topljivih tvari. Ovom se inačicom spojevi koji se teško određuju konvencionalnim postupkom, npr. octena kiselina, često uspješno kvantificiraju. Ipak, ni ova metoda nije uspješna u slučaju piridina. Povećanjem koncentracije kalijevog dikromata na 0,25 N (0,0416 M), kako je propisano u (1), olakšava se izravnu odvagu 5 – 10 mg tvari, što je jako važno kod određivanja KPK tvari koje su slabo topljive u vodi (2).

U protivnom se KPK određuje bilo kojom prikladnom nacionalnom ili međunarodnom normiranom metodom.

2. **PODACI I OCJENJIVANJE**

KPK u pokusnoj tikvici izračunava se pomoću odabrane standardizirane metode i pretvara u grame KPK po gramu ispitivane tvari.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

Treba navesti primijenjenu metodu.

Kemijska potrošnja kisika predstavlja srednju vrijednost najmanje tri mjerenja. Potrebno je navesti sve informacije i napomene bitne za tumačenje rezultata, posebno u pogledu nečistoća, fizikalnog stanja i unutarnjih svojstava tvari (ako su poznata) koja mogu utjecati na rezultate.

Ako se koristi živin sulfat za smanjivanje utjecaja klorida, to također treba navesti.

4. **REFERENCE**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Popis normiranih metoda npr.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. RAZGRADNJA – ABIOTIČKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KAO FUNKCIJA PH

1. METODA

Ova ispitna metoda istovjetna je smjernici OECD TG 111 (2004.).

1.1. UVOD

Kemikalije mogu ući u površinske vode različitim putevima, kao što je izravna primjena, rasap, otjecanje, ocjeđivanje, odlaganje otpada, poljoprivredne, industrijske i komunalne otpadne vode ili atmosfersko taloženje, i u tim vodama sudjelovati u procesima kemijske (npr. hidroliza, oksidacija), fotokemijske i/ili mikrobe pretvorbe. Ova smjernica opisuje laboratorijsku ispitnu metodu za ocjenjivanje abiotičkih hidrolitičkih pretvorbi kemikalija u vodenim sustavima pri pH vrijednostima koje se obično javljaju u okolišu (pH 4 – 9), a temelji se na postojećim smjernicama (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Pokusima se određuje i. brzina hidrolize ispitivane tvari kao funkcija pH i ii. identitet odnosno vrsta i brzina tvorbe i razgradnje proizvoda hidrolize kojima organizmi mogu biti izloženi. Ovakva se istraživanja mogu zahtijevati za kemikalije koje se izravno unose u vodu ili koje mogu dospjeti u okoliš nekim drugim od gore navedenih puteva.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Vidjeti Dodatak 2.

1.3. PRIMJENLJIVOST METODE

Metoda se općenito primjenjuje kod kemikalija (neobilježene i obilježene) za koje postoji dovoljno točna i osjetljiva analitička metoda. Ona se može primijeniti na blago hlapljive i nehlapljive spojeve koji su dovoljno topljivi u vodi. Test ne treba primjenjivati u slučaju kemikalija koje su jako hlapljive iz vode (npr. fumiganti, organska otapala) te se stoga ne mogu zadržati u otopini u pokusnim uvjetima ovog testa. Provedba ispitivanja može biti otežana ako se ispituju tvari koje su minimalno topljive u vodi (8).

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Sterilne vodene puferske otopine različitih pH vrijednosti (pH 4, 7 i 9) obrade se ispitivanom tvari i inkubiraju u mraku u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (pri stalnim temperaturama). Puferske se otopine u odgovarajućim vremenskim razmacima analiziraju na ispitivanu tvar i proizvode hidrolize. Bilancu mase lakše je utvrditi kod obilježenih ispitivanih tvari (npr. ^{14}C).

Ova se metoda ispitivanja temelji na višerazinskom pristupu, koji je prikazan i objašnjen u Dodatku 1. Svaka razina uvjetovana je rezultatima prethodne razine.

▼B

1.5. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Za mjerenje brzine hidrolize mogu se koristiti neobilježene ili obilježene ispitivane tvari. Obilježenom se materijalu općenito daje prednost kod proučavanja puta hidrolize i određivanja bilance mase, iako u posebnim slučajevima označivanje nije bezuvjetno potrebno. Preporučuje se ^{14}C obilježavanje, ali korisna je i primjena drugih izotopa kao što su ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Ako je to moguće, oznaku treba staviti na najstabilni dio odnosno dijelove molekule. Primjerice, ako ispitivana tvar sadrži jedan prsten, oznaka se mora staviti na taj prsten; ako ispitivana tvar sadrži dva ili više prstenova, ponekad je potrebno provesti posebna istraživanja kako bi se ocijenila sudbina svakog obilježenog prstena i dobile potrebne informacije o tvorbi proizvoda hidrolize. Čistoća ispitivane tvari treba biti najmanje 95 %.

Prije hidrolitičkog ispitivanja trebaju biti raspoložive sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) topljivost u vodi (ispitna metoda A.6.);

(b) topljivost u organskim otapalima;

(c) tlak pare (ispitna metoda A.4.) i/ili konstanta Henryjevog zakona;

(d) podjelni koeficijent n-oktanol/voda (ispitna metoda A.8.);

(e) konstanta disocijacije (pK_a) (smjernica OECD 112) (9);

(f) brzina izravne i neizravne fotokemijske pretvorbe u vodi, prema potrebi.

Trebaju biti raspoložive analitičke metode za kvantifikaciju ispitivane tvari te, prema potrebi, identificiranje i kvantifikaciju proizvoda hidrolize u vodenim otopinama (vidjeti također odjeljak 1.7.2.).

1.6. REFERENTNE TVARI

Gdje god je to moguće, treba koristiti referentne tvari za identificiranje i kvantifikaciju proizvoda hidrolize spektroskopskim i kromatografskim metodama ili drugim metodama prikladne osjetljivosti.

1.7. KRITERIJI KAKVOĆE

1.7.1. **Iskorištenje**

Prve naznake ponovljivosti analitičke metode i uspješnosti jednolike primjene ispitivane tvari mogu se dobiti analizom najmanje dvije paralelne puferske otopine ili njihovih ekstrakata neposredno nakon dodavanja ispitivane tvari. Iskorištenje u kasnijim fazama pokusa proizlazi iz odgovarajućih bilanci mase (ako se koristi obilježeni materijal). Iskorištenje bi se kod obilježenih i neobilježenih kemikalija trebalo kretati u području od 90 % do 110 % (7). Ako je ovo područje tehnički teško postići, kod neobilježenih je kemikalija prihvatljivo iskorištenje od 70 %, ali u tom slučaju treba navesti odgovarajuće obrazloženje.

▼B

1.7.2. **Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode odnosno metoda koje se koriste za kvantifikaciju ispitivane tvari i proizvoda hidrolize u kasnijim fazama može se provjeriti dvostrukom analizom istih puferskih otopina (ili njihovih ekstrakata) nakon što nastanu dovoljne količine proizvoda hidrolize za kvantifikaciju.

Analitička metoda treba biti dovoljno osjetljiva za kvantifikaciju koncentracija ispitivane tvari na razini 10 % ili manje početne koncentracije. Ako je to relevantno, analitičke metode također trebaju biti dovoljno osjetljive za kvantifikaciju svih proizvoda hidrolize koji čine 10 % ili više primijenjene koncentracije (u bilo kom trenutku tijekom istraživanja) na razini 25 % ili manje njihove vršne koncentracije.

1.7.3. **Intervali pouzdanosti za kinetičke podatke o hidrolizi**

Intervale pouzdanosti treba izračunati i prikazati za sve koeficijente regresije, konstante brzine, vremena poluraspada i sve duge kinetičke parametre (npr. DT50).

1.8. OPIS ISPITNE METODE

1.8.1. **Oprema i aparatura**

Istraživanje treba provesti u staklenim posudama (npr. epruvete, male tikvice), po potrebi u mraku i u sterilnim uvjetima, osim ako preliminarni podaci (kao što je podjelni koeficijent n-oktanol/voda) ukazuju na to da ispitivana tvar prianja na staklo. U tom slučaju treba razmisliti o primjeni alternativnih materijala (kao što je teflon). Problem prianjanja na staklo se osim toga može ublažiti primjenom jedne ili više sljedećih metoda:

— određivanjem mase ispitivane tvari i proizvoda hidrolize sorbiranih na ispitnu posudu,

— korištenjem ultrazvučne kupelji,

— pranjem svog staklenog posuđa otapalom u svakom intervalu uzorkovanja,

— korišenjem formuliranih proizvoda,

— korištenjem veće količine suotapala za dodavanje ispitivane tvari u sustav; ako se koristi suotapalo, to treba biti otapalo koje ne hidrolizira ispitivanu tvar.

Za inkubaciju različitih ispitnih otopina uglavnom su potrebne tresilice u vodenoj kupelji s regulacijom temperature ili inkubatori s termostatom.

Potrebna je standardna laboratorijska oprema, posebno:

— mjerač pH vrijednosti,

▼B

— analitički instrumenti, kao što su oprema za GC, HPLC, TLC, uključujući odgovarajuće detekcijske sustave za analiziranje radioaktivno obilježenih i neobilježenih tvari ili inverznu metodu razrjeđenja izotopa,

— instrumenti za potrebe identifikacije (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd.),

— tekućinski scintilacijski brojač,

— ljevci za odjeljivanje kod ekstrakcije tekuće-tekuće,

— instrumenti za koncentriranje otopina i ekstrakata (npr. rotacijski isparivač),

— uređaj za regulaciju temperature (npr. vodena kupelj).

Kemijski reagensi, uključuju npr.:

— organska otapala, analitički čista, npr. heksan, diklormetan itd.,

— scintilacijsku tekućinu,

— puferske otopine (za pojedinosti vidjeti odjeljak 1.8.3.).

Svo stakleno posuđe, analitički čista voda i puferske otopine koje se koriste kod hidrolitičkih ispitivanja trebaju biti sterilizirani.

1.8.2. **Primjena ispitivane tvari**

Ispitivana se tvar dodaje u različite puferske otopine u obliku vodene otopine (vidjeti Dodatak 3.). Ako je to nužno za postizanje dostatnog otapanja, dopuštena je uporaba malih količina otapala mješljivih s vodom (kao što je acetonitril, aceton, etanol) za primjenu i razdiobu ispitivane tvari, ali ona u pravilu ne bi smjela prijeći 1 % v/v. Ako se razmatra uporaba više koncentracije otapala (npr. u slučaju slabo topljivih ispitivanih tvari), ona se može dopustiti samo ako se dokaže da otapalo nema utjecaja na hidrolizu ispitivane tvari.

Korištenje formuliranih proizvoda načelno se ne preporučuje, budući da se ne može isključiti utjecaj sastojaka formulacije na proces hidrolize. Ipak, u slučaju ispitivanih tvari koje su slabo topljive u vodi i tvari koje prianjaju na staklo (vidjeti odjeljak 1.8.1.) korištenje formuliranog materijala može biti prikladna alternativa.

Treba koristiti jednu koncentraciju ispitivane tvari; ona ne smije biti viša od 0,01 M ili pola koncentracije zasićenja (vidjeti Dodatak 1.).

▼B

1.8.3. **Puferske otopine**

Hidrolitičko ispitivanje treba provoditi pri pH vrijednosti 4, 7 i 9. U tu svrhu treba pripremiti puferske otopine s analitički čistim kemikalijama i vodom. Neki korisni puferski sustavi prikazani su u Dodatku 3. Valja napomenuti da primijenjeni puferski sustav može utjecati na brzinu hidrolize; ako se uoče ovakve pojave, treba primijeniti alternativni puferski sustav ([1]).

pH svake puferske otopine treba provjeriti baždarenim mjeračem pH vrijednosti s preciznošću od najmanje 0,1 na traženoj temperaturi.

1.8.4. **Ispitni uvjeti**

1.8.4.1. *Ispitna temperatura*

Hidrolitičke pokuse treba provoditi na stalnoj temperaturi. Za potrebe ekstrapolacije važno je održavati temperaturu barem u granicama ± 0,5 °C.

Ako je hidrolitičko ponašanje ispitivane tvari nepoznato, treba obaviti preliminarno ispitivanje (1. razina) na temperaturi od 50 °C. Kinetička ispitivanja više razine treba provoditi na najmanje tri temperature (uključujući ispitivanje na 50 °C), osim ako je ispitivanje 1. razine pokazalo da je ispitivana tvar hidrolitički stabilna. Preporučeno temperaturno područje je 10 – 70 °C (po mogućnosti s najmanje jednom temperaturom ispod 25 °C), što obuhvaća temperaturu izvješćivanja od 25 °C i većinu temperatura koje se pojavljuju u praksi.

1.8.4.2. *Svjetlost i kisik*

Sva hidrolitička ispitivanja treba obaviti prikladnim metodama kako bi se izbjegli fotolitički učinci. Osim toga, treba provesti sve prikladne mjere da se izbjegne stvaranje kisika (npr. 5-minutno upuhivanje helija, dušika ili argona prije pripreme otopine).

1.8.4.3. *Trajanje ispitivanja*

Preliminarno ispitivanje treba trajati 5 dana, dok ispitivanja više razine treba provoditi dok se ne postigne 90 %-tna hidroliza ispitivane tvari ili 30 dana, ovisno o tome što je kraće.

1.8.5. **Provođenje ispitivanja**

1.8.5.1. *Preliminarno ispitivanje (1. razina)*

Preliminarno se ispitivanje provodi na temperaturi 50 ± 0,5 °C i uz pH 4,0, 7,0 i 9,0. Ako je nakon 5 dana hidroliza manja od 10 % ($t_{0,5\ 25\ °C} > 1$ godina), ispitivana se tvar smatra hidrolitički stabilnom i u pravilu nije potrebno dodatno ispitivanje. Ako je poznato da je tvar nestabilna na okolišno relevantnim temperaturama ([2]), preliminarno ispitivanje nije potrebno. Analitička metoda mora biti dovoljno precizna i osjetljiva da može otkriti 10 %-tno smanjenje početne koncentracije.

([1]) Mabey i Mill preporučuju uporabu boratnih ili acetatnih pufera umjesto fosfatnih (11).

([2]) Ove informacije mogu potjecati i iz drugih izvora, kao što su hidrolitički podaci za strukturno slične spojeve iz literature ili iz drugih preliminarnih polukvantitativnih hidrolitičkih ispitivanja s ispitivanom tvari u ranijoj razvojnoj fazi.

▼B

1.8.5.2. *Hidroliza nestabilnih tvari (2. razina)*

Ispitivanje više razine (napredno ispitivanje) treba provesti s pH vrijednostima pri kojima se ispitivana tvar pokazala nestabilnom u preliminarnom ispitivanju. Puferske otopine ispitivane tvari treba termostatski održavati na odabranim temperaturama. Kod ispitivanja reakcija prvog reda svaku reakcijsku otopinu treba analizirati u vremenskim razmacima koji omogućuju da se dobije najmanje šest razmaknutih točaka podataka, u pravilu između 10 % i 90 % hidrolize ispitivane tvari. Treba uzeti paralelne ispitne uzorke (najmanje dva uzorka iz odvojenih reakcijskih posuda) i sadržaj analizirati u najmanje šest vremena uzorkovanja (za najmanje dvanaest točaka podataka ponavljanja). Smatra se da nije dovoljno koristiti jedan zbirni uzorak iz kojega se vade pojedinačni alikvoti ispitne otopine u svakom intervalu uzorkovanja jer u tom slučaju nije moguća analiza varijabilnosti podataka, a usto se može pojaviti i problem onečišćenja ispitne otopine. Ispitivanja za potvrdu sterilnosti treba provesti na kraju ispitivanja više razine (tj. na 90 % hidrolize ili 30 dana). Ipak, ako nije uočena razgradnja (tj. pretvorba), smatra se da ispitivanja sterilnosti nisu potrebna.

1.8.5.3. *Identifikacija proizvoda hidrolize (3. razina)*

Odgovarajućim analitičkim metodama treba identificirati sve značajne proizvode hidrolize, a barem one koji čine > 10 % primijenjene doze.

1.8.5.4. *Dodatna ispitivanja*

Kod ispitivanja hidrolitički nestabilnih tvari ponekad je potrebno provesti dodatna ispitivanja uz pH vrijednosti različite od 4, 7 i 9. Primjerice, kod ispitivanja u fiziološke svrhe ponekad su potrebni kiseliji uvjeti (npr. pH 1,2), uz primjenu jedne fiziološki relevantne temperature (37 °C).

2. **PODACI**

Količine ispitivane tvari i hidrolitičkih proizvoda (ako je to relevantno) navode se u postocima primijenjene početne koncentracije te, prema potrebi, u mg/l za svaki interval uzorkovanja i za svaki pH i ispitnu temperaturu. Osim toga, ako se koristi obilježena ispitivana tvar, treba navesti bilancu mase u postotku primijenjene početne koncentracije.

U izvješću treba dati grafički prikaz logaritamski transformiranih podataka koncentracija ispitivane tvari u vremenu. Potrebno je identificirati sve značajne proizvode hidrolize, ili barem one koji čine ≥ 10 % primijenjene doze te dati grafički prikaz njihovih logaritamski transformiranih koncentracija na isti način kao za polaznu tvar tako da budu vidljive brzine tvorbe i razgradnje.

▼B

2.1. OBRADA REZULTATA

Točnije određivanje vremena poluraspada i vrijednosti DT_{50} trebalo bi se postići izračunima uz pomoć odgovarajućih kinetičkih modela. U izvješću treba navesti vrijeme poluraspada i/ili vrijednosti DT_{50} (uključujući granice pouzdanosti) za svaki pH i temperaturu, zajedno s opisom primijenjenog modela, redom kinetike i koeficijentom određivanja (r^2). Prema potrebi, te izračune treba provesti i za proizvode hidrolize.

U slučaju istraživanja brzine na različitim temperaturama, konstante brzine hidrolize pseudo prvog reda (k_{obs}) treba opisati kao funkciju temperature. Izračun se temelji na podjeli k_{obs} na konstante brzine za kiselinski kataliziranu, neutralnu i bazično kataliziranu hidrolizu (k_H, $k_{neutral}$ i k_{OH}) i na Arrheniusovoj jednadžbi:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

gdje su A_i i B_i regresijske konstante odsječka odnosno nagiba najboljih pravaca dobivenih linearnom regresijom ln k_i prema recipročnoj vrijednosti apsolutne temperature u kelvinima (T). Primjenom Arhheniusovih odnosa za kiselinski kataliziranu, neutralnu i bazično kataliziranu hidrolizu mogu se izračunati konstante brzine pseudo prvog reda, a time i vrijeme poluraspada za druge temperature kod kojih nije moguće izravno određivanje konstante brzine pokusom (10).

2.2. VREDNOVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

Većina hidrolitičkih reakcija prati prividne brzine reakcije prvog reda te je prema tomu vrijeme poluraspada neovisno o koncentraciji (vidjeti jednadžbu 4 u Dodatku 2.). To obično omogućava primjenu laboratorijskih rezultata dobivenih pri 10^{-2} do 10^{-3} M na uvjete okoliša ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey i Mill dali su nekoliko primjera dobre podudarnosti između brzina hidrolize za različite kemikalije izmjerenih u čistim i prirodnim vodama (11), ako su izmjereni i pH i temperatura.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju sadrži barem sljedeće informacije:

ispitivana tvar:

— trivijalni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (uz naznaku položaja oznake, ako se koristi radioaktivno obilježeni materijal) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva (vidjeti odjeljak 1.5.),

— čistoća (nečistoće) ispitivane tvari,

— čistoća oznake obilježene kemikalije i molarna aktivnost (prema potrebi).

▼B

— Puferske otopine:

— datumi i pojedinosti pripreme,

— upotrijebljeni puferi i voda,

— molarnost i pH puferskih otopina.

Ispitni uvjeti:

— datumi provođenja istraživanja,

— primijenjena količina ispitivane tvari,

— metoda primjene i otapala (vrsta i količina) korištena za primjenu ispitivane tvari,

— volumen inkubiranih puferiranih otopina ispitivane tvari,

— opis korištenog inkubacijskog sustava,

— pH i temperatura tijekom istraživanja,

— vremena uzorkovanja,

— metoda(-e) ekstrakcije,

— metode kvantifikacije i identifikacije ispitivane tvari i njezinih proizvoda hidrolize u puferskim otopinama,

— broj ponavljanja.

Rezultati:

— ponovljivost i osjetljivost primijenjenih analitičkih metoda,

— iskorištenje (% za valjano istraživanje navedeni su u odjeljku 1.7.1.),

— podaci ponavljanja i srednje vrijednosti u tabličnom obliku,

— bilanca mase za vrijeme i na kraju istraživanja (ako se koristi obilježena ispitivana tvar),

— rezultati preliminarnog ispitivanja,

— rasprava i tumačenje rezultata,

— svi izvorni podaci i slike.

Sljedeće su informacije potrebne samo ako se određuje brzina hidrolize:

— grafički prikazi koncentracije u vremenu za ispitivane tvari te, prema potrebi, za proizvode hidrolize pri svakoj pH vrijednosti i temperaturi,

— tablice rezultata Arrheniusove jednadžbe za temperaturu 20 °C/25 °C s pH, konstantom brzine (h^{-1} ili dan^{-1}), vremenom poluraspada ili DT_{50}, temperaturama (°C), uključujući granice pouzdanosti i koeficijente korelacije (r^2) ili usporedive podatke,

— predloženi put hidrolize.

▼B

4. **REFERENCE**

(1) OECD, (1981) Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency, (1982) 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Europska Unija (EU), (1995) Direktiva Komisije 95/36/EZ o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ o stavljanju na tržišta proizvoda za zaštitu biljaka. Prilog V.: Opstanak i ponašanje u okolišu.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA, (1980) Merkblatt No 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD, (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

(9) OECD, (1993) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

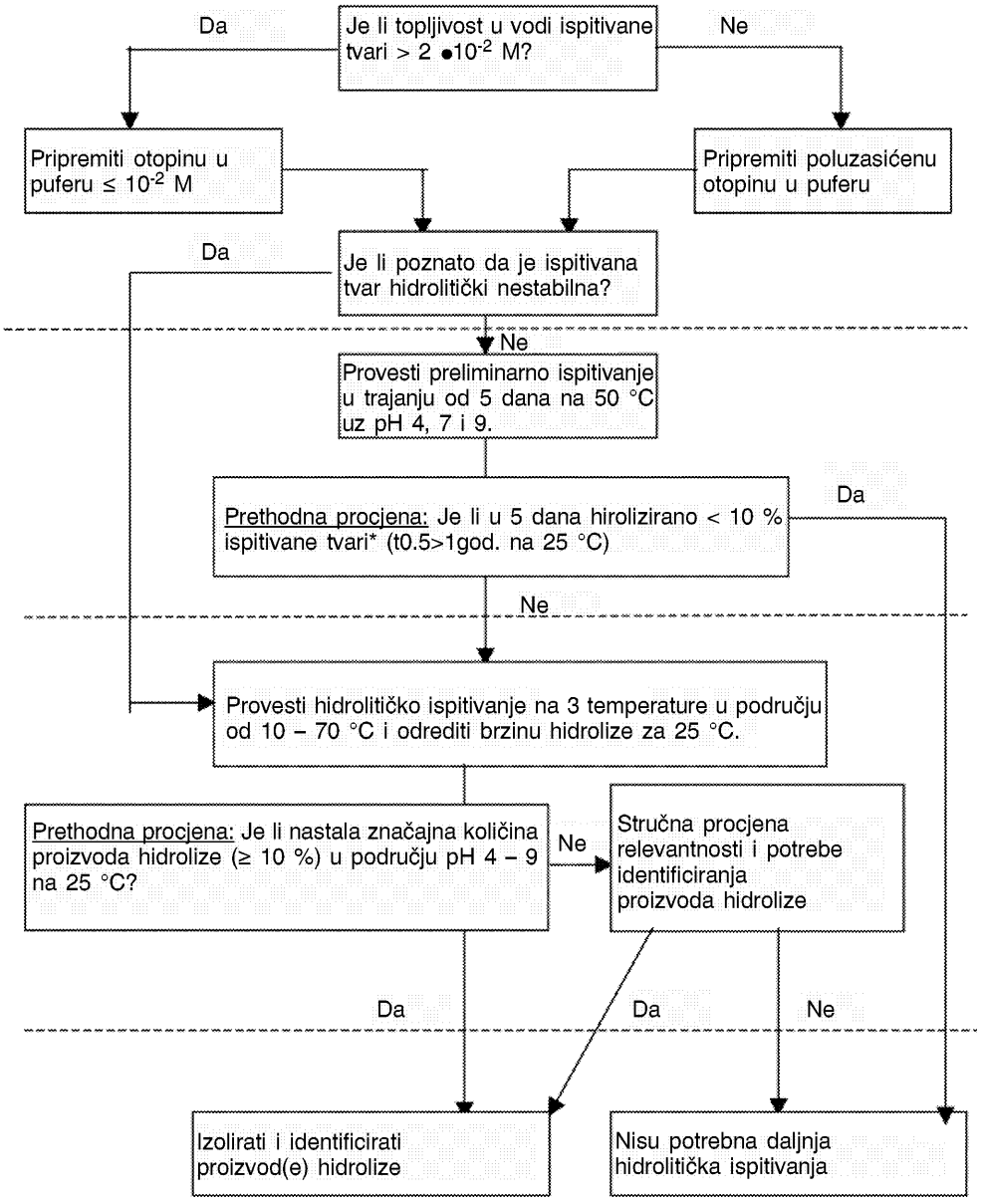
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P., (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T., (1978) Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, str. 383-415.

▼B

Dodatak 1.

Višerazinska shema hidrolitičkog testa



* 10 %-tna hidroliza ispitivane tvari na 50 °C odgovara vremenu poluraspada od približno 30 dana, što približno odgovara vrijednosti od 1 godine na 20 °C.

▼B

Dodatak 2.

Definicije i jedinice

U svim slučajevima treba koristiti jedinice **Međunarodnog sustava jedinica (SI).**

Ispitivana tvar: bilo koja tvar, bilo da se radi o polaznom spoju ili relevantnim proizvodima pretvorbe.

Proizvodi pretvorbe: sve tvari koje nastaju u biotičkim ili abiotičkim reakcijama pretvorbe ispitivane tvari.

Proizvodi hidrolize: sve tvari koje nastaju u reakcijama hidrolitičke pretvorbe ispitivane tvari.

Hidroliza: reakcija ispitivane tvari RX s vodom kod koje u središtu reakcije dolazi do neto zamjene skupine X s OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Brzina opadanja koncentracije RX u ovom pojednostavnjenom procesu izražava se kao

brzina = k $[H_2O]$ [RX] reakcija drugog reda

ili

brzina = k [RX] reakcija prvog reda ovisno o koraku koji određuje brzinu.

Budući da količina vode obilato premašuje količinu ispitivane tvari, ova se vrsta reakcije obično opisuje kao reakcija pseudo prvog reda, gdje se utvrđena konstanta brzine izražava kao odnos

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

i može se odrediti iz izraza (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

gdje je:

t = vrijeme

C_o, C_t = koncentracije RX u vremenu 0 i t.

Jedinice ove konstante imaju dimenzije (vrijeme)$^{-1}$, a vrijeme poluraspada reakcije (vrijeme potrebno za reakciju 50 % RX) izražava se kao

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Vrijeme poluraspada: ($t_{0,5}$) vrijeme potrebno za 50 %-tnu hidrolizu ispitivane tvari, ako se reakcija može opisati kinetikom prvog reda; ono je neovisno o koncentraciji.

(*) Ako grafički prikaz logaritamski transformiranih podataka u ovisnosti o vremenu ne ukazuje na linearnu funkciju (izjednačeni s brzinom reakcije prvog reda), tada za određivanje konstante brzine hidrolize ispitivanog spoja nije primjereno koristiti jednadžbu.

▼B

DT_{50} (vrijeme nestajanja 50): vrijeme u kojemu se koncentracija ispitivane tvari smanji za 50 %; ono je različito od vremena poluraspada $t_{0,5}$ ako reakcija ne prati kinetiku prvog reda.

Procjena k na različitim temperaturama

Ako su konstante brzine poznate za dvije temperature, konstante brzine pri drugim temperaturama mogu se izračunati pomoću Arrheniusove jednadžbe:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ sau } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Grafičkim prikazom ln k u ovisnosti o 1/T dobije se pravac s nagibom - E/R

gdje je:

k = konstanta brzine, mjerena na različitim temperaturama

E = energija aktivacije [kJ/mol]

T = apsolutna temperatura [K]

R = plinska konstanta [8,314 J/mol.K]

Energija aktivacije izračunana je regresijskom analizom ili pomoću sljedeće jednadžbe:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

gdje je $T_2 > T_1$.

▼B

Dodatak 3.

Puferski sustavi

A. **CLARK I LUBS:**

Puferske smjese po Clarku i Lubsu (*)

Sastav	pH
0,2 N HCl i 0,2 N KCl na 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl razr. do 100 ml	2,2
0,1 M kalijev biftalat + 0,1 N HCl na 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat do 100 ml	3,8
0,1 M kalijev biftalat + 0,1 N NaOH na 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	4,8

(*) pH vrijednosti navedene u ovim tablicama izračunane su na temelju mjerenja potencijala primjenom Sörensenovih standardnih jednadžbi (1909.). Odgovarajuće pH vrijednosti su za 0,04 jedinice više od vrijednosti u tablici.

▼B

Sastav	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat do 100 ml	6,0

Puferske smjese po Clarku i Lubsu (nastavak)

0,1 M monokalijev fosfat + 0,1 N NaOH na 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat do 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 u 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH na 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borna kiselina do 100 ml	10,0

B. **KALTHOFF I VLEESCHHOUWER:**

Citratni puferi po Kalthoffu i Vleeschhouweru

Sastav	pH
0,1 M monokalijev citrat i 0,1 N HCl na 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat do 100 ml	3,6
0,1 M monokalijev citrat i 0,1 N NaOH na 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat do 100 ml	6,0

(*) Doda se kristalić timola ili slične tvari kako bi se spriječio rast plijesni.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boratne smjese po Sörensenu

Sastav		Sörensen 18 °C	Walbum, pH na		
ml boraks	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraks + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraks + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Fosfatne smjese po Sörensenu

Sastav	pH
0,0667 M monokalijev fosfat + 0,0667 M dinatrijev fosfat na 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOKSIČNOST ZA GUJAVICE**

TEST S UMJETNIM TLOM

1. **METODA**

1.1. UVOD

U ovom se laboratorijskom testu ispitivana tvar dodaje u umjetno tlo i u njemu drže gujavice tijekom 14 dana. Nakon tog vremena (i fakultativno nakon sedam dana) provjerava se letalni učinak tvari na gujavice. Ovaj test je relativno brz način provjere učinka kemikalija na gujavice kod unosa kroz kožu i putem hrane.

1.2. DEFINICIJA I JEDINICA

LC_{50}: procijenjena koncentracija tvari koja ubija 50 % ispitanih životinja u razdoblju ispitivanja.

1.3. REFERENTNA TVAR

Periodičnim korištenjem referentne tvari treba se uvjeriti da se osjetljivost ispitnog sustava nije značajno promijenila.

Preporučena referentna tvar je analitički čisti kloracetamid.

1.4. NAČELO ISPITIVANJA

Tlo je promjenljiv medij; stoga se u ovom testu koristi pažljivo definirano umjetno ilovasto tlo. Odrasle gujavice vrste *Eisenia foetida* (vidjeti napomenu u Dodatku) drže se u definiranom umjetnom tlu obrađenom različitim koncentracijama ispitivane tvari. 14 dana (i fakultativno 7 dana) nakon početka ispitivanja sadržaj spremnika se rasprostre na podložak i prebroje gujavice koje su preživjele pri svakoj koncentraciji.

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

Plan ispitivanja treba osigurati maksimalnu obnovljivost s obzirom na ispitni supstrat i organizam. Da bi ispitivanje bilo valjano, smrtnost u kontrolama na kraju ispitivanja ne smije biti viša od 10 %.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. ***Materijali***

1.6.1.1. Osnovni supstrat

Kao osnovni ispitni supstrat koristi se definirano umjetno tlo.

(a) Osnovni supstrat (postoci su na bazi suhe mase)

— 10 % Sphagnum treseta (što bliže pH području od 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka i fino usitnjen),

▼B

— 20 % kaolinitske gline, po mogućnosti s više od 50 % kaolinita,

— oko 69 % industrijskog kremenog pijeska (u kojemu prevladava fini pijesak s više od 50 % čestica veličine 0,05 do 0,2 mm). Ako tvar nije dovoljno disperzivna u vodi, 10 g po ispitnom spremniku treba ostaviti za kasnije miješanje s ispitivanom tvari,

— oko 1 % kalcijevog karbonata ($CaCO_3$) u prahu, kemijski čistog, dodaje se za podešavanje pH na 6,0 ± 0,5.

(b) Ispitni supstrat

Ispitni supstrat sadrži osnovni supstrat, ispitivanu tvar i deioniziranu vodu.

Sadržaj vode treba iznositi oko 25 do 42 % suhe mase osnovnog supstrata. Sadržaj vode supstrata određuje se sušenjem uzorka na 105 °C dok se ne postigne stalna masa. Ključni je kriterij da umjetno tlo bude dobro natopljeno, ali ne prekriveno vodom. Kod miješanja treba paziti da se postigne ravnomjerna razdioba ispitivane tvari i supstrata. U izvješću o ispitivanju treba navesti kako je ispitivana tvar uvedena u supstrat.

(c) Kontrolni supstrat

Kontrolni supstrat sadrži osnovni supstrat i vodu. Ako se koristi dodatak, treba predvidjeti još jedan kontrolni supstrat koji sadrži istu količinu dodatka.

1.6.1.2. Ispitni spremnici

Stakleni spremnici zapremnine oko jedne litre (prekriveni odgovarajućim plastičnim poklopcima, zdjelicama ili plastičnom folijom s rupama za ventilaciju) napunjeni mokrim ispitnim ili kontrolnim supstratom u količini koja odgovara 500 g suhe mase supstrata.

1.6.2. *Ispitni uvjeti*

Spremnike treba držati u klima komorama na temperaturi od 20 ± 2 °C uz neprekidno osvjetljenje. Jakost svjetlosti treba biti 400 do 800 luksa.

Razdoblje ispitivanja je 14 dana, ali se smrtnost može fakultativno odrediti i sedam dana nakon početka ispitivanja.

1.6.3. *Ispitni postupak*

Ispitne koncentracije

Koncentracije ispitivane tvari izražavaju se kao masa tvari po suhoj masi osnovnog supstrata (mg/kg).

Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona

Ovim se ispitivanjem može odrediti raspon koncentracija u kojemu nastupa smrtnost od 0 do 100 % i tako pribaviti informacije o rasponu koncentracija koje treba koristiti u glavnom ispitivanju.

▼B

Tvar treba ispitati u sljedećim koncentracijama: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg tvari po kilogramu ispitnog supstrata (suha masa).

Ako će se provesti potpuno glavno ispitivanje, za preliminarno ispitivanje je dovoljno uzeti po jednu ispitnu seriju po koncentraciji i jednu neobrađenu kontrolnu seriju, svaka po 10 gujavica.

Glavno ispitivanje

Na temelju rezultata preliminarnog ispitivanja treba odabrati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu koje obuhvaćaju područje smrtnosti od 0 do 100 % i koje se razlikuju za stalni faktor koji nije viši od 1,8.

Ispitivanja s tim nizom koncentracija moraju omogućiti što precizniju procjenu vrijednosti LC_{50} i njezinih granica pouzdanosti.

U glavnom se ispitivanju koriste najmanje četiri ispitne serije po koncentraciji i četiri neobrađene kontrolne serije, svaka po 10 gujavica. Rezultati ponavljanja navode se kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

Ako dvije uzastopne koncentracije u omjeru 1,8 daju samo 0 % i 100 % smrtnosti, te su dvije vrijednosti dovoljne da se pokaže raspon unutar kojega se nalazi LC_{50}.

Smjesa osnovnog ispitnog supstrata i ispitivane tvari

Ispitni supstrat bi kad god je to moguće trebalo pripremiti bez ikakvih dodataka, osim vode. Ispitivana tvar emulgirana ili dispergirana u deioniziranoj vodi ili drugom otapalu se neposredno prije početka ispitvanja pomiješa s osnovnim ispitnim supstratom ili ravnomjerno poprska finim kromatografskim ili sličnim raspršivačem.

Ako je ispitivana tvar netopljiva u vodi, ona se može otopiti u što manjoj količini prikladnog organskog otapala (npr. heksan, aceton ili kloroform).

Za otapanje, dispergiranje odnosno emulgiranje ispitivane tvari smiju se koristiti samo lako hlapljiva sredstva. Ispitni supstrat treba prozračiti prije uporabe. Količinu isparene vode treba nadomjestiti. Kontrolni supstrat mora sadržavati istu količinu aditiva.

Ako se ispitivana tvar ne otapa, ne dispergira i ne emulgira u organskom otapalu, 10 g smjese fino usitnjenog kremenog pijeska i ispitivane tvari u količini koja je potrebna za obradu 500 g suhe mase umjetnog tla treba pomiješati s 490 g suhe mase ispitnog supstrata.

Za svaku se ispitnu seriju pripremi stakleni spremnik s količinom mokrog ispitnog supstrata koja odgovara 500 g suhe mase i na površinu ispitnog supstrata stavi se 10 gujavica, koje su prije toga 24 sata aklimatizirane u sličnom mokrom osnovnom supstratu i zatim kratko oprane i osušene filtar-papirom.

▼B

Spremnici se prekriju peforiranim plastičnim poklopcima, zdjelicama ili folijom kako bi se spriječilo isušivanje supstrata i drže se u ispitnim uvjetima 14 dana.

Ocjenjivanje se provodi 14 dana (i fakultativno 7 dana) nakon početka ispitivanja. Supstrat se raširi na ploči od stakla ili nehrđajućeg čelika. Gujavice se pregledaju i odredi broj preživjelih gujavica. Gujavice se smatraju mrtvima ako ne reagiraju na nježni mehanički podražaj na prednjem kraju.

Ako se obavlja pregled nakon sedam dana, supstrat se vrati u spremnik i preživjele se gujavice ponovno stave na isti ispitni supstrat.

1.6.4. *Ispitni organizmi*

Ispitni organizmi su odrasle gujavice *Eisenia foetida* (vidjeti napomenu u Dodatku) (najmanje dva mjeseca stare, s klitelumom) mokre mase 300 do 600 mg. (Za način uzgoja vidjeti Dodatak).

2. **PODACI**

2.1. OBRADA I VREDNOVANJE REZULTATA

Navedu se ispitane koncentracije tvari s odgovarajućim postocima mrtvih gujavica.

Ako se dobiju odgovarajući podaci, treba izračunati LC_{50} i granice pouzdanosti (p = 0,05) primjenom standardnih metoda (Litchfield i Wilcoxon, 1949., ili istovjetna metoda). LC_{50} treba navesti u mg ispitne tvari po kilogramu ispitnog supstrata (suha masa).

Ako je nagib krivulje koncentracije prevelik za izračun LC_{50}, dovoljna je grafička procjena te vrijednosti.

Ako dvije uzastopne koncentracije u omjeru 1,8 daju samo 0 % i 100 % smrtnosti, te su dvije vrijednosti dovoljne da se pokaže raspon unutar kojega se nalazi LC_{50}.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju po mogućnosti sadrži sljedeće informacije:

— izjavu da je ispitivanje obavljeno u skladu s gore navedenim kriterijima kakvoće,

— vrstu ispitivanja (ispitivanje za određivanje raspona i/ili glavno ispitivanje),

— točan opis ispitnih uvjeta ili izjava da je ispitivanje obavljeno u skladu s metodom; treba navesti sva odstupanja,

— točan opis kako je ispitivana tvar uvedena u osnovni ispitni supstrat,

— informacije o ispitnim organizmima (vrsta, dob, srednja masa i raspon mase, uvjeti držanja i uzgoja, dobavljač),

▼B

— metoda određivanja LC_{50},

— rezultate ispitivanja, uključujući sve korištene podatke,

— opis uočenih simptoma i promjena u ponašanju ispitnih organizama,

— smrtnost u kontrolama,

— LC_{50} ili najvišu ispitanu koncentraciju bez smrtnosti i najnižu ispitanu koncentraciju sa 100 %-nom smrtnošću 14 dana (i fakultativno 7 dana) nakon početka ispitivanja,

— prikaz krivulje koncentracija/odgovor,

— rezultate dobivene s referentnom tvari, bilo u vezi s ovim ispitivanjem ili iz ranijih ispitivanja u svrhu kontrole kakvoće.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, str. 331.

(3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

(4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, str. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardised laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Dodatak

Uzgoj i držanje gujavica prije ispitivanja

30 do 50 odraslih gujavica stavi se u uzgojnu kutiju sa svježim supstratom i izvadi nakon 14 dana. Te se životinje mogu koristiti za daljnje uzgojne serije. Gujavice koje se izvale iz kokona koriste se u ispitivanjima kad budu zrele (u propisanim uvjetima nakon dva do tri mjeseca).

Uvjeti držanja i uzgoja

Klima komora: temperatura 20 ± 2 °C, po mogućnosti uz neprekidno osvjetljenje (intenzitet 400 do 800 luksa).

Uzgojne kutije: prikladni plitki spremnici zapremnine od 10 do 20 l.

Supstrat: *Eisenia foetida* se može uzgajati u različitim vrstama životinjskih izlučevina. Preporučuje se da se kao uzgojni medij koristi smjesa koja sadrži 50 % volumnog udjela treseta i 50 % kravljeg ili konjskoga gnoja. Medij treba imati pH vrijednost oko 6 do 7 (podešava se kalcijevim karbonatom) i nisku ionsku vodljivost (manje od 6 mmho ili 0,5 % koncentracije soli).

Supstrat treba biti vlažan, ali ne premokar.

Osim gornje metode mogu se primijeniti i drugi uspješni postupci.

Napomena: Postoje dvije pasmine *Eisenia foetida*, koje su neki taksonomi podijelili u dvije vrste (Bouche, 1972). One su morfološki slične, ali jedna od njih, *Eisenia foetida foetida*, ima tipične poprečne pruge ili prstenove na segmentima, dok ih druga, *Eisenia foetida andrei*, nema i prošarana je crvenim pjegama. Ako je to moguće, treba koristiti *Eisenia foetida andrei*. Mogu se koristiti i druge vrste ako je raspoloživa potrebna metodologija.

▼B

C.9. **BIORAZGRADNJA**

ZAHN-WELLENSOV TEST

1. **METODA**

1.1. UVOD

Svrha je ove metode ocijeniti potencijalnu potpunu biorazgradivost vodotopljivih nehlapljivih organskih tvari kod izlaganja relativno visokim koncentracijama mikroorganizama u statičkom ispitivanju.

Pritom može doći do fizikalno-kemijske adsorpcije na suspendiranu krutu tvar, što treba uzeti u obzir kod tumačenja rezultata (vidjeti 3.2.).

Ispitivane se tvari koriste u koncentracijama koje odgovaraju vrijednostima DOC-a u području od 50 do 400 mg/l odnosno vrijednostima KPK u području od 100 do 1 000 mg/l (DOC = Dissolved Organic Oxygen, otopljeni organski ugljik; KPK = kemijska potrošnja kisika). Prednost ovih relativno visokih koncentracija je njihova analitička pouzdanost. Spojevi s toksičnim svojstvima mogu odgoditi odnosno kočiti proces razgradnje.

U ovoj se metodi mjera koncentracije otopljenog organskog ugljika odnosno kemijske potrošnje kisika koristi za ocjenjivanje potpune biorazgradivosti.

Istovremenom primjenom specifične analitičke metode moguće je ocijeniti i primarnu biorazgradnju tvari (nestajanje polazne kemijske strukture).

Metoda se primjenjuje samo na one organske ispitivane tvari koje su u koncentraciji koja se koristi u ispitivanju:

— topljive u vodi u ispitnim uvjetima,

— imaju zanemariv tlak pare u ispitnim uvjetima,

— nemaju inhibitorni učinak na bakterije,

— adsorbiraju se tek u ograničenoj mjeri unutar ispitnog sustava,

— ne gube se iz ispitne otopine pjenjenjem.

Kod tumačenja dobivenih rezultata korisno je imati informacije o relativnim udjelima glavnih komponenti ispitivanog materijala, posebno ako su dobivene vrijednosti niske ili granične.

Informacije o toksičnosti tvari za mikroorganizme poželjne su za tumačenje niskih vrijednosti i odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija.

▼B

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

Vrijednost razgradnje dobivena na kraju ispitivanja navodi se kao „biorazgradivost iz Zahn-Wellensovog testa”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}}\right] \times 100$$

gdje je:

DT = biorazgradnja (%) u vremenu T

CA = vrijednosti DOC-a (ili KPK) u ispitnoj smjesi izmjerene tri sata nakon početka ispitivanja (mg/l) (DOC = Dissolved Organic Oxygen, otopljeni organski ugljik; KPK = kemijska potrošnja kisika)

CT = vrijednosti DOC-a ili KPK u ispitnoj smjesi u vremenu uzorkovanja (mg/l)

CB = vrijednost DOC-a ili KPK slijepe probe u vremenu uzorkovanja (mg/l)

CBA = vrijednost DOC-a ili KPK slijepe probe izmjerena tri sata nakon početka ispitivanja (mg/l)

Stupanj razgradnje zaokružuje se na najbliži puni postotak.

Postotak razgradnje navodi se kao postotak opadanja DOC-a (ili KPK) ispitivane tvari.

Razlika između izmjerene vrijednosti nakon tri sata i izračunane odnosno, po mogućnosti, izmjerene početne vrijednosti može pružiti korisne informacije o eliminaciji tvari (vidjeti 3.2. Tumačenje rezultata).

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari mogu biti korisne kod ispitivanja novih tvari; međutim, još se ne mogu preporučiti određene referentne tvari.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

U staklenu posudu zapremnine od jedne do četiri litre, opremljenu mješalicom i napravom za dozračivanje, stave se zajedno, u vodenoj otopini, aktivni mulj, mineralni nutrijenti i ispitivani materijal kao jedini izvor ugljika. Smjesa se miješa i dozračuje na 20 do 25 °C pod difuznim osvjetljenjem ili u mračnom prostoru do 28 dana. Proces razgradnje prati se određivanjem vrijednosti DOC-a (ili KPK) u filtriranoj otopini u dnevnim ili u drugim odgovarajućim redovitim vremenskim razmacima. Omjer eliminiranog DOC-a (ili KPK) nakon svakog intervala i vrijednosti tri sata nakon početka ispitivanja izražava se kao postotak biorazgradnje i služi kao mjera stupnja razgradnje u tom trenutku. Dobiveni se rezultati grafički prikazuju u ovisnosti o vremenu kako bi se dobila krivulja razgradnje.

Ako se koristi specifična analitička metoda, mogu se izmjeriti promjene koncentracije polazne molekule uslijed biorazgradnje (primarna biorazgradivost).

▼B

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

U prstenastom je testu dokazana zadovoljavajuća obnovljivost ovog testa.

Osjetljivost metode u velikoj je mjeri ovisna o varijabilnosti slijepe probe te, u manjoj mjeri, o preciznosti određivanja otopljenog organskog ugljika i koncentraciji ispitivanog spoja u otopini.

1.6. OPIS ISPITNOG POSTUPKA

1.6.1. *Priprema*

1.6.1.1. Reagensi

Ispitna voda: voda za piće sa sadržajem organskog ugljika < 5 mg/l. Koncentracija kalcijevih i magnezijevih iona zajedno ne smije biti viša od 2,7 mmol/l; u protivnome je treba dostatno razrijediti deioniziranom ili destiliranom vodom.

Sumporna kiselina, analitički reagens (A.R.):	50 g/l
Otopina natrijevog hidroksida A.R.:	40 g/l
Mineralna hranjiva otopina: u jednoj litri deionizirane vode se otopi:	
amonijev klorid, NH4Cl, A.R.:	38,5 g
natrijev dihidrogenfosfat, NaH2PO4.2H2O, A.R.:	33,4 g
kalijev dihidrogenfosfat, KH2PO4, A.R.:	8,5 g
dikalijev monohidrogenfosfat, K2HPO4, A.R.:	21,75 g

Smjesa istodobno služi kao nutrijent i kao puferski sustav.

1.6.1.2. Aparatura

Staklene posude zapremnine od jedne do četiri litre (npr. cilindrične posude).

Mješalica sa staklenim ili metalnim mješačem na odgovarajućoj osovini (mješač se treba vrtiti oko 5 do 10 cm iznad dna posude). Umjesto toga može se koristiti magnetska mješalica s polugom dužine od 7 do 10 cm.

Staklena cjevčica unutarnjeg promjera od 2 do 4 mm za uvođenje zraka. Otvor cjevčice treba biti oko 1 cm iznad dna posude.

Centrifuga (oko 3 550 g).

Mjerač pH vrijednosti.

Mjerač otopljenog kisika.

Papirni filtri.

▼B

Uređaj za membransku filtraciju.

Membranski filtri, veličina pora 0,45 μm. Membranski filtri su prikladni pod uvjetom da ne otpuštaju ugljik i ne apsorbiraju tvar tijekom filtracije.

Analitička oprema za određivanje sadržaja organskog ugljika i kemijske potrošnje kisika.

1.6.1.3. Priprema inokuluma

Aktivni mulj iz postrojenja za biološko pročišćavanje pere se (višekratnim) centrifugiranjem ili taloženjem s ispitnom vodom (gore).

Aktivni mulj mora biti u prikladnom stanju. Takav se mulj može dobiti iz ispravnog postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Da bi se dobilo što je moguće više različitih vrsta ili sojeva bakterija mogu se pomiješati inokulumi iz različitih izvora (npr. različita postrojenja za pročišćavanje, ekstrakti tla, rječna voda itd.). Smjesu treba obraditi na način kako je gore opisano.

Za provjeru aktivnosti aktivnog mulja vidjeti odjeljak „Funkcionalna kontrola” u nastavku.

1.6.1.4. Priprema ispitnih otopina

U ispitnu se posudu stavi 500 ml ispitne vode, 2,5 ml/l mineralne hranjive otopine i aktivni mulj u količini koja odgovara 0,2 do 1,0 g/l suhe tvari u konačnoj smjesi. Doda se dovoljna količina radne otopine ispitivane tvari tako da se u konačnoj smjesi dobije koncentracija DOC-a od 50 do 400 mg/l. Odgovarajuće vrijednosti KPK iznose 100 do 1 000 mg/l. Zatim se nadopuni ispitnom vodom do ukupnog volumena od jedne do četiri litre. Ukupni se volumen odabire ovisno o broju uzoraka koji će se uzeti za određivanje DOC-a ili KPK i količinama koje su potrebne za analitički postupak.

U pravilu je dovoljan volumen od dvije litre. Na svaki ispitni niz dolazi barem po jedna kontrolna posuda (slijepa proba), koja se paralelno ispituje; ona sadrži samo aktivni mulj i mineralnu hranjivu otopinu nadopunjenu ispitnom vodom do istog ukupnog volumena kao ispitne posude.

1.6.2. *Provođenje ispitivanja*

Ispitne se posude miješaju magnetskim mješalicama ili propelerima pod difuznim osvjetljenjem ili u mračnom prostoru na 20 do 25 °C. Dozračivanje se provodi komprimiranim zrakom očišćenim kroz pamučni filtar i, prema potrebi, u boci za pranje plina. Treba voditi računa da se mulj ne taloži i da koncentracija kisika ne padne ispod 2 mg/l.

pH vrijednost treba provjeravati u redovitim razmacima (npr. dnevno) i prema potrebi podesiti na pH 7 do 8.

▼B

Gubici uslijed isparavanja nadoknađuju se neposredno prije uzorkovanja odgovarajućim količinama deionizirane ili destilirane vode. Ispravan postupak je označiti razinu tekućine na posudi prije početka ispitivanja. Nakon svakog se uzorkovanja stavljaju nove oznake (bez dozračivanja i miješanja). Prvi se uzorci uvijek uzimaju tri sata nakon početka ispitivanja kako bi se utvrdila adsorpcija ispitivanog materijala na aktivni mulj.

Eliminacija ispitivanog materijala prati se određivanjem DOC-a odnosno KPK u dnevnim ili drugim redovitim razmacima. Uzorci iz ispitne posude i slijepe probe filtriraju se kroz pažljivo oprani papirni filtar. Prvih 5 ml filtrata ispitne se otopine baca. Muljevi koji se teško filtriraju mogu se prethodno ukloniti 10-minutnim centrifugiranjem. Provode se barem dva paralelna određivanja DOC-a i KPK. Ispitivanje traje do 28 dana.

Napomena: uzorci koji ostanu mutni filtriraju se kroz membranske filtre. Membranski filtri ne smiju otpuštati niti adsorbirati organski materijal.

Funkcionalna kontrola aktivnog mulja

Na svaki ispitni niz dolazi po jedna posuda u kojoj se paralelno ispituje poznata tvar za provjeru funkcionalne sposobnosti aktivnog mulja. Pokazalo se da je za to prikladan dietilenglikol.

Prilagodba

Ako se analize provode u relativno kratkim razmacima (npr. dnevno), prilagodba se može jasno prepoznati iz krivulje razgradnje (vidjeti sliku 2.). Ispitivanje stoga ne treba započinjati neposredno prije vikenda.

Ako prilagodba nastupi na kraju razdoblja, ispitivanje se može produžiti dok se razgradnja ne završi.

Napomena: ako je potrebno šire poznavanje ponašanja prilagođenog mulja, isti se aktivni mulj još jedanput izloži istom ispitivanom materijalu u skladu sa sljedećim postupkom:

isključi se mješalica i naprava za dozračivanje i pričeka da se aktivni mulj istaloži. Ukloni se supernatant, nadopuni do dvije litre ispitnom vodom, miješa 15 minuta i ponovno pusti da se mulj istaloži. Nakon što se supernatant ponovno ukloni, preostali se mulj koristi za ponovljeno ispitivanje s istim materijalom u skladu s 1.6.1.4. i 1.6.2. gore. Aktivni mulj se umjesto taloženjem može izolirati i centrifugiranjem.

Prilagođeni se mulj može pomiješati sa svježim muljem da se dobije koncentracija od 0,2 do 1 g suhe mase po litri.

▼B

Sredstva za analizu

Uzorci se u pravilu filtriraju kroz pažljivo oprani papirni filtar (za pranje treba koristiti deioniziranu vodu).

Uzorci koji ostanu mutni filtriraju se kroz membranske filtre (0,45 μm).

Koncentracija DOC-a u filtratima uzorka određuje se dvostruko (prvih se 5 ml baca) pomoću instrumenta za TOC. Ako se filtrat ne može analizirati istog dana, treba ga čuvati u hladnjaku do sljedećeg dana. Duže se skladištenje ne preporučuje.

Koncentracija KPK u filtratima uzorka određuje se analitički postupkom opisanim u (2) u nastavku.

2. **PODACI I VREDNOVANJE**

Koncentracije DOC-a i/ili KPK u uzorcima određuju se barem dvostruko u skladu s 1.6.2. gore. Razgradnja u vremenu T izračunava se pomoću formule (s definicijama) iz 1.2. gore.

Stupanj razgradnje zaokružuje se na najbliži puni postotak. Opseg razgradnje postignut na kraju ispitivanja navodi se kao „biorazgradivost iz Zahn-Wellensovog testa”.

Napomena: Ako se potpuna razgradnja postigne prije isteka predviđenog vremena ispitivanja i ako taj rezultat potvrdi druga analiza sljedećeg dana, ispitivanje se može okončati.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju po mogućnosti sadrži sljedeće:

— početnu koncentracija tvari,

— sve ostale informacije i rezultate pokusa u vezi s ispitivanom tvari, referentnom tvari (ako se koristi) i slijepom probom,

— koncentraciju nakon tri sata,

— biorazgradnjom: krivulja s opisom,

— datumom i mjestom skupljanja ispitnih organizama, stanje prilagodbe, upotrijebljena koncentracija itd.,

— znanstveni razlozi mogućih izmjena ispitnog postupka.

3.2. TUMAČENJE REZULTATA

Postupno opadanje DOC-a (KPK) tijekom više dana ili tjedana ukazuje na to da se ispitivana tvar biološki razgrađuje.

▼B

Ipak, u pojedinim slučajevima može imati utjecaja i fizikalno-kemijska adsorpcije, na što ukazuje potpuno ili djelomično opadanje na samom početku ispitivanja, unutar prva tri sata, i neočekivano mala razlika između kontrolnog i ispitnog supernatanta.

Ako je potrebno razlikovati biorazgradnju (ili djelomičnu biorazgradnju) od adsorpcije, treba provesti dodatna ispitivanja.

To se može učiniti na više načina, ali najpouzdaniji način je provesti ispitivanje osnovne razine koristeći supernatant ili mulj kao inokulum (po mogućnosti respirometrijski test).

Ispitivane tvari koje u ovom testu pokazuju značajno smanjenje DOC-a (KPK) koje nije uvjetovano adsorpcijom mogu se smatrati potencijalno biorazgradivim. Djelomično neadsorptivno opadanje ukazuje na to da je kemikalija barem donekle podložna biorazgradnji. Malo opadanje ili nepromijenjena razina DOC-a (KPK) može biti posljedica inhibitornog učinka ispitivane tvari na mikroorganizme, što se također može očitovati razlaganjem i gubitkom mulja i zamućenjem supernatanta. Ispitivanje treba ponoviti s nižom koncentracijom ispitivane tvari.

Primjenom specifične analitičke metode za spoj ili ^{14}C obilježene ispitivane tvari može se povećati osjetljivost. U slučaju ^{14}C obilježenog spoja, pojava biorazgradnje se može potvrditi izdvajanjem $^{14}CO_2$.

Ako se rezultati navode i kao primarna biorazgradnja, treba po mogućnosti objasniti promjenu kemijske strukture zbog koje izostaje odgovor polazne ispitivane tvari.

Potrebno je navesti validaciju analitičke metode zajedno s odgovorom medija slijepe probe.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Prilog V C.9 Razgradivost: kemijska potreba za kisikom, Direktiva Komisije 84/449/EEZ, (SL L 251,19.9.1984., str. 1.).

▼B

Dodatak

PRIMJER VREDNOVANJA

Organski spoj:	4-etoksibenzojeva kiselina
Teoretska ispitna koncentracija:	600 mg/l
Teoretski DOC:	390 mg/l
Inokulum:	postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda …
Koncentracija:	1 gram suhe tvari/l
Stanje prilagodbe:	nije prilagođen
Analiza:	određivanje DOC-a
Količina uzorka:	3 ml
Kontrolna tvar:	dietilenglikol
Toksičnost spoja:	nema toksičnih učinaka ispod 1 000 mg/l Primijenjeni test:

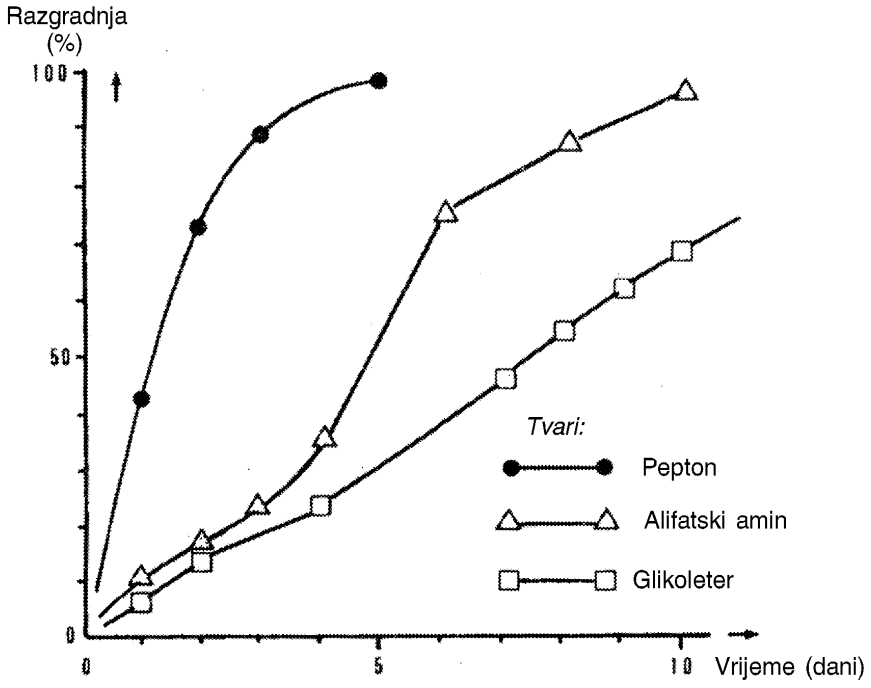
Vrijeme ispitivanja	Kontrolna tvar				Ispitivana tvar		
	Slijepa proba DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC neto mg/l	Razgradnja %	DOC ([1]) mg/l	DOC neto mg/l	Razgradnja %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 sata	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dan	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dana	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dana	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dana	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dana	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dana	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dana	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dana	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Srednje vrijednosti trostrukog određivanja.

▼B

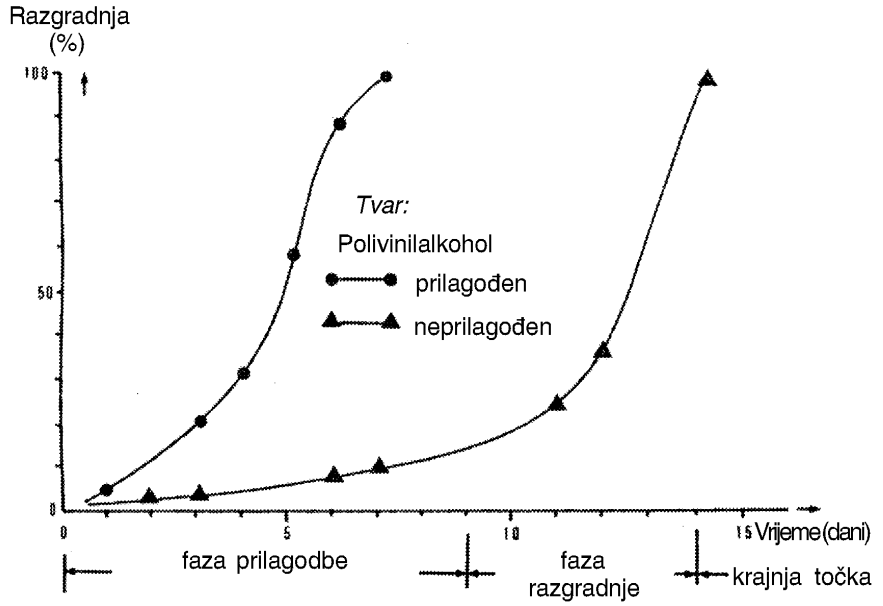
Slika 1.

Primjeri krivulja biorazgradnje



Slika 2.

Primjeri prilagodbe mulja



▼M4

C.10. **SIMULACIJSKI TEST AEROBNOG PROČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA C.10-A: JEDINICE S AKTIVNIM MULJEM - C.10-B: BIOFILMOVI**

C.10-A: Jedinice s aktivnim muljem

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 303 (2001.). Pedesetih godina prošlog stoljeća došlo je do spoznaje da nanovo uvedeni surfaktanti izazivaju prekomjerno pjenjenje u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda i u rijekama. Oni se tada nisu u cijelosti uklanjali tijekom aerobnog pročišćavanja, a u nekim su slučajevima i ograničavali opadanje ostalih organskih tvari. To je potaklo brojna istraživanja o načinu na koji bi se surfaktanti mogli ukloniti iz otpadnih voda i jesu li nove kemikalije koje se proizvode u industriji prikladne za pročišćavanje otpadnih voda. Da bi se to ostvarilo, koristili su se modeli uređaja koji su predstavljali dvije osnovne vrste aerobnog biološkog pročišćavanja otpadnih voda (aktivni mulj i perkolacijska ili kapajuća filtracija). Bilo bi nepraktično vrlo skupo distribuirati svaku novu kemikaliju i nadzirati postrojenja za pročišćavanje velikih razmjera, čak i na lokalnoj razini.

POČETNA RAZMATRANJA

Jedinice s aktivnim muljem

2. Opisani su modeli jedinica s aktivnim muljem veličine (u rasponu) od 300 ml do oko 2 000 ml. Neki su modeli izvrsno oponašali postrojenja velikih razmjera s taložnicama iz kojih se istaloženi mulj crpi natrag u aeracijski bazen, a drugi su bili opremljeni taložnicama, npr. Swisher (1). Veličina aparature podliježe kompromisu: s jedne strane, ona mora biti dovoljno velika za uspješan mehanički rad i za osiguravanje dovoljne količine uzoraka, a da pritom to ne utječe na rad, a s druge strane, ne bi smjela biti toliko velika da zahtijeva prekomjerni prostor i materijale.

3. Dvije vrste aparature koje su se dosad naširoko i na zadovoljavajući način primjenjivale su Husmannove jedinice (2) i jedinice s propusnom posudom (3)(4), koje su se prve koristile u studiji surfaktanata i opisuju se u ovoj ispitnoj metodi. Uspješno se primjenjuju i druge jedinice također uspješno primjenjuju, npr. Eckenfelder (5). Zbog relativno visokih troškova i velikih napora pri primjeni ovog simulacijskog testa istodobno su se istraživali jednostavniji i jeftiniji testovi probira, koji su sada sadržani u poglavlju C.4 AF ovog Priloga (6). Iskustvo s brojnim surfaktantima i drugim kemikalijama pokazalo je da su se upravo one kemikalije koje su prošle na testovima probira (lako biorazgradive) razgrađivale i u ovom simulacijskom testu. Neke od kemikalija koje nisu prošle na testovima probira prošle su na testovima inherentne biorazgradivosti (poglavlja C.12 (7) i C.19 (8) ovog Priloga), ali su se samo neke od kemikalija iz potonje skupine razgradile u simulacijskom testu, dok se one kemikalije koje nisu prošle na testovima kojima inherentne biorazgradivosti nisu razgradile u simulacijskim testovima (9)(10)(11).

4. Za neke su svrhe dostatni simulacijski testovi provedeni u jedinstvenom skupu radnih uvjeta; njihovi se rezultati izražavaju kao postotak opadanja ispitivane kemikalije ili otopljenog organskog ugljika (DOC). U ovoj ispitnoj metodi naveden je i opis takvog testa. Međutim, za razliku od prethodne verzije ovog poglavlja, u kojoj je opisan samo jedan tip aparature kojom se pročišćavaju sintetičke otpadne vode načinom rada „s povezanim

▼M4

jedinicama" relativno grubim metodama izdvajanja mulja, u ovom tekstu nudi se cijeli niz varijacija. Opisuju se alternativne vrste aparature, način rada te uklanjanje iz otpadnih voda i izdvajanje mulja. Ovaj tekst počiva na tekstu norme ISO 11733 (12), koji je temeljito ispitan tijekom svoje pripreme iako sama metoda nije bila podvrgnuta prstenastom testu.

5. Za druge je svrhe potrebno preciznije odrediti koncentraciju ispitivane kemikalije u otpadnoj vodi pa je za to potrebna opsežnija metoda. Tako se, primjerice, svakog dana i tijekom trajanja testa brzina izdvajanja mulja mora preciznije kontrolirati, a jedinice se moraju ispitati na cijelom nizu brzina izdvajanja. Za potpuno sveobuhvatnu ispitnu metodu testove bi također trebalo provoditi na dvije ili tri različite temperature. Tu je metodu opisao Birch (13)(14), a u sažetom obliku navedena je u Dodatku 6. Međutim, sadašnje znanje nije dovoljno da se donese odluka o tomu koji se kinetički modeli mogu primijeniti na biorazgradnju kemikalija u pročišćavanju otpadnih voda i u vodenom okolišu općenito. Primjena Monodove kinetike, koja je kao primjer navedena u Dodatku 6., ograničena je na kemikalije prisutne u koncentraciji od 1 mg/l i višoj, ali je po mišljenju nekih i to tek potrebno dokazati. Testovi na koncentracijama koje bolje odražavaju one utvrđene u otpadnim vodama navedeni su u Dodatku 7., ali su takvi testovi, kao i oni iz Dodatka 6., uvršteni u dodatke umjesto da se objave kao zasebne ispitne metode.

Filtri

6. Mnogo je manje pažnje posvećeno modelima perkolacijskih filtara, i to možda zbog toga što su oni složeniji i manje kompaktni od modela postrojenja s aktivnim muljem. Gerike i sur. razvili su jedinice s kapajućim filtrima i radili su s njima u načinu rada „s povezanim jedinicama" (15). Ti su filtri bili relativno veliki (visine 2 m; volumena 60 l) i za svaki je bilo potrebno i do 2 l/h otpadnih voda. Baumann i sur. (16) simulirali su kapajuće filtre umetanjem traka od poliesterskog „flisa" u cjevčice od 1 m (unutarnjeg promjera 14 mm) nakon što bi trake namakali 30 minuta u koncentriranom aktivnom mulju. Ispitivana kemikalija, kao jedini izvor ugljika u otopini mineralnih soli, ulila bi se u okomitu cjevčicu te je procjenjivana njezina biorazgradnja iz mjerenja DOC-a u otpadnoj vodi i CO_2 u otpadnom plinu.

7. Biofiltri se simuliraju na drukčiji način (15); u unutarnju površinu rotirajućh cjevčica, nagnutih pod malim kutom u odnosu na horizontalu, ulijevaju se otpadne vode (oko 250 ml/h) s ispitivanom kemikalijom ili bez nje pa se u skupljenoj izlaznoj vodi analizira količina DOC-a i/ili specifična ispitivana kemikalija.

NAČELO ISPITIVANJA

8. Ova je metoda namijenjena za određivanje eliminacije primarne i/ili potpune biorazgradnje organskih kemikalija topljivih u vodi pomoću aerobnih mikroorganizama u ispitnom sustavu koji neprekidno radi, simulirajući tako proces koji se odvija u aktivnom mulju. Lako biorazgradivi organski medij i organska ispitivana kemikalija predstavljaju izvore ugljika i energije za te mikroorganizme.

9. Dvije ispitne jedinice koje neprekidno rade (postrojenja s aktivnim muljem ili propusne posude) pogone se paralelno i u istim uvjetima koji se biraju tako da odgovaraju svrsi testa. Srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja obično iznosi 6 h, a srednja starost mulja (vrijeme zadržavanja mulja) iznosi 6 do 10 dana. Mulj se izdvaja jednom od dviju metoda, ispitivana kemikalija obično se dodaje u koncentraciji otopljenog organskog ugljika (DOC) između 10 mg/l i 20 mg/l ulaznoj vodi (organskom mediju) samo jedne jedinice. Druga se jedinica koristi kao kontrolna jedinica kako bi se odredila biorazgradnja organskog medija.

▼M4

10. Iz često uzimanih uzoraka izlazne vode određuju se, po mogućnosti, DOC ili kemijska potrošnja kisika (KPK), zajedno s koncentracijom ispitivane kemikalije (ako je potrebno), i to specifičnom analizom izlazne vode iz jedinice u koju se dodaje ispitivana kemikalija. Pretpostavlja se da je razlika između koncentracije DOC-a i KPK-a u izlaznoj vodi u ispitnoj i kontrolnoj jedinici rezultat ispitivane kemikalije ili njezinih organskih metabolita. Ta se razlika uspoređuje s koncentracijom DOC-a ili KPK-a u ulaznoj vodi koja je rezultat ispitivane kemikalije dodane kako bi se odredila eliminacija ispitivane kemikalije.

11. Biorazgradnja se obično može razlikovati od bioadsorpcije pomnim ispitivanjem krivulje vremena eliminacije i obično se može potvrditi primjenom testa biorazgradnje pomoću aklimatiziranog inokuluma iz jedinice u koju se dodaje ispitivana kemikalija.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

12. Trebali bi biti poznati čistoća, topljivost u vodi, hlapljivost i adsorpcijska svojstva ispitivane kemikalije kako bi se omogućilo ispravno tumačenje rezultata. Normalno hlapljive i netopljive kemikalije mogu se ispitivati samo ako se poduzmu posebne mjere opreza (vidjeti Dodatak 5.). Također bi trebala biti poznata i kemijska struktura ili barem empirijska formula kako bi se izračunale teorijske vrijednosti i/ili provjerile izmjerene vrijednosti parametara, na primjer teoretska potrošnja kisika (TPK), otopljeni organski ugljik (DOC) i kemijska potrošnja kisika (KPK).

13. Informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije za mikroorganizme (vidjeti Dodatak 4.) mogu biti korisne za odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija te mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje.

RAZINE PROLAZNOSTI

14. U prvoj primjeni ovog simulacijskog (potvrdnog) testa na primarnu biorazgradnju surfaktanata potrebno je opadanje specifične kemikalije veće od 80 % prije nego što se surfaktant smije staviti na tržište. Ako se ne postigne vrijednost od 80 %, može se primijeniti simulacijski (potvrdni) test, a surfaktant se smije staviti na tržište tek ako specifična kemikalija opadne za više od 90 %. Kod kemikalija općenito nije riječ o pozitivnom ili negativnom rezultatu testa, a dobivena vrijednost postotka opadanja može se upotrijebiti u približnim izračunima vjerojatne koncentracije u okolišu koja će se koristiti u procjeni opasnosti koju te kemikalije predstavljaju. Rezultati obično odgovaraju pravilu „sve ili ništa”. U nizu studija o čistim kemikalijama dobiveni su rezultati s postotkom opadanja DOC-a > 90 % za više od tri četvrtine kemikalija te > 80 % za više od 90 % kemikalija koje su pokazale znatniji stupanj biorazgradivosti.

15. Relativno malen broj kemikalija (npr. surfaktanti) prisutan je u otpadnim vodama u koncentracijama (oko 10 mg C/l) koje se koriste u ovom testu. Neke kemikalije u tim koncentracijama mogu imati inhibitorni učinak, dok se kinetika opadanja nekih drugih kemikalija može razlikovati u niskim koncentracijama. Do preciznije procjene razgradnje može se doći primjenom modificiranih metoda kod kojih se upotrebljavaju realistično niske koncentracije ispitivane kemikalije, a prikupljeni bi se podaci mogli koristiti za izračun kinetičkih konstanti. Međutim, još uvijek nisu potvrđene neophodne pokusne tehnike niti su uspostavljeni kinetički modeli koji opisuju reakcije biorazgradnje (vidjeti Dodatak 7.).

▼M4

REFERENTNE KEMIKALIJE

16. Kako bi se osiguralo ispravno provođenje pokusnog postupka, korisno je povremeno, istodobno s istraživanjem ispitivanih kemikalija, ispitati kemikalije za koje je poznato kako se ponašaju. Takve kemikalije obuhvaćaju adipinsku kiselinu, 2-fenil fenol, 1-naftol, difensku kiselinu, 1-naftolnu kiselinu itd. (9)(10)(11).

MJERNA OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITIVANJA

17. Znatno je manji broj izvješća o studijama simulacijskih testova nego testova lake biorazgradivosti. Mjerna obnovljivost u (istodobnim) višestrukim određivanjima je dobra (unutar 10 - 15 %) za ispitivane kemikalije koje se razgrađuju za 80 % ili više, ali za slabije razgradive kemikalije veća je varijabilnost. Isto tako, kod nekih graničnih kemikalija zabilježeni su znatno različiti rezultati (npr. 10 %, 90 %) u različitim prilikama tijekom 9 tjedana testa.

18. Male su razlike pronađene u rezultatima dobivenima s dvije vrste aparature, ali su se neke kemikalije razgrađivale bolje i dosljednije u prisustvu komunalnih otpadnih voda nego sintetičkih otpadnih voda prema smjernici OECD-a.

OPIS ISPITNE METODE

Aparatura

Sustav ispitivanja

19. Sustav ispitivanja za jednu ispitivanu kemikaliju sastoji se od ispitne jedinice i kontrolne jedinice, ali kada se provode samo specifične analize (primarna biorazgradnja), potrebna je samo ispitna jedinica. Ista se kontrolna jedinica može koristiti za nekoliko ispitnih jedinica u koje se dodaju iste ili različite ispitivane kemikalije. U slučaju načina rada „s povezanim jedinicama” (Dodatak 3.) svaka ispitna jedinica mora imati svoju kontrolnu jedinicu. Sustav ispitivanja može biti model postrojenja s aktivnim muljem, Husmannova jedinica (Dodatak 1., slika 1.) ili propusna posuda (Dodatak 1., slika 2.). U oba su slučaja potrebne posude, dovoljno velike i za ulaznu i za izlaznu vodu, kao i dozirne crpke za ulaznu vodu, pomiješanu s otopinom ispitivane kemikalije ili odvojeno.

20. Svaka jedinica postrojenja s aktivnim muljem sastoji se od dozračne posude poznatog kapaciteta od 3 oko litre aktivnog mulja i separatora (sekundarni pročišćavač) zapremine od oko 1,5 litre; volumeni se u izvjesnoj mjeri mogu i mijenjati prilagodbom visine separatora. Dopuštena je primjena posuda različite veličine ako one rade pod usporedivim hidrauličkim opterećenjima. Ako nije moguće održavati temperaturu u ispitnoj prostoriji u željenom rasponu, preporučuje se primjena posuda s vodenim omotačem s vodom kontrolirane temperature. „Air-lift” crpka ili dozirna crpka koriste se za recirkulaciju aktivnog mulja iz separatora u dozračnu posudu, neprekidno ili s prekidima u redovnim razmacima.

21. Sustav s propusnom posudom sastoji se od unutarnjeg, propusnog cilindra sa stožastim dnom koji se nalazi u malo većoj posudi istog oblika, ali sačinjenoj od nepropusnog plastičnog materijala. Prikladan materijal za propusnu posudu je propusni polietilen maksimalne veličine pora 90 μm i debljine 2 mm. Razdvajanje mulja od pročišćavanog organskog medija odvija se diferencijalnim prolaskom kroz propusnu stjenku. Izlazna se voda skuplja u prstenastom prostoru iz kojih se prelijeva u sabirnu posudu. Nema taloženja te stoga nema ni vraćanja mulja. Cijeli se sustav može montirati u vodenoj kupelji kontrolirane temperature. Propusne se

▼M4

posude začepljuju i mogu se prelijevati u početnim etapama. U tom slučaju potrebno je zamijeniti propusno punjenje čistim punjenjem, pri čemu se mulj iz posude kroz sifon propusti u čistu kantu, a začepljeno punjenje izvadi. Nakon što se obriše nepropusni vanjski cilindar, umetne se čisto punjenje i mulj se vrati u posudu. Sav mulj koji se zalijepi na stjenke začepljenog punjenja također se pažljivo sastruže i prenese. Začepljene posude čiste se prvo blagim mlazom vode kako bi se uklonio preostali mulj, potom namakanjem u otopini razrijeđenog natrijeva hipoklorita, potom u vodi i na kraju se temeljito isperu vodom.

22. Za dozračivanje mulja u dozračnim posudama obiju sustava potrebne su prikladne tehnike, primjerice sinterirani kamen (zračni kamen) i komprimirani zrak. Zrak se pročišćava, po potrebi, propuštanjem kroz odgovarajući filtar i pranjem. Kroz sustav mora proći dostatna količina zraka da bi se zadržali aerobni uvjeti i da se pahulje mulja zadrže u suspenziji cijelo vrijeme trajanja testa.

Aparatura za filtraciju ili centrifuga

23. Uređaj za filtraciju uzoraka pomoću membranskih filtara prikladne propusnosti (nazivni promjer otvora 0,45 μm) koji adsorbira topljive organske kemikalije i ispušta organski ugljik u minimalnoj količini. Ako se koriste filtri koji ispuštaju organski ugljik, filtri se pažljivo operu vrućom vodom kako bi se uklonio organski ugljik koji curi. Druga je mogućnost primjena centrifuge koja može proizvesti 40 000 m/s^2.

Analitička oprema

24. Aparatura potrebna za određivanje:

— DOC-a (otopljenog organskog ugljika) i TOC-a (ukupnog organskog ugljika) ili KPK-a (kemijske potrošnje kisika),

— specifične kemikalije, ako je potrebno,

— suspendiranih krutih tvari, pH-a, koncentracije kisika u vodi,

— temperature, kiselosti i lužnatosti,

— amonijaka, nitrita i nitrata ako se test provodi u uvjetima nitrifikacije.

Voda

25. Voda iz slavine koja sadrži manje od 3 mg/l DOC-a. Odredite lužnatost ako već nije poznata.

26. Deionizirana voda koja sadržava manje od 2 mg/l DOC-a.

Organski medij

27. Kao organski medij dopuštene su sintetičke otpadne vode, komunalne otpadne vode ili njihova kombinacija. Pokazalo se (11) (14) da uporaba samo komunalnih otpadnih voda često dovodi do povećanog postotka opadanja DOC-a pa čak i da omogućuje opadanje i biorazgradnju nekih kemikalija koje se biološki ne razgrađuju kada se upotrebljavaju sintetičke otpadne vode prema smjernici OECD-a. Isto tako, neprekidno dodavanje ili dodavanje s prekidima komunalnih otpadnih voda često stabilizira aktivni mulj, uključujući i njegovu ključnu sposobnost dobrog taloženja. Dakle, preporučuje se uporaba komunalnih otpadnih voda. Izmjerite koncentraciju DOC-a ili KPK-a u svakoj novoj šarži organskog medija. Trebala bi biti poznate kiselost ili lužnatost organskog medija. Moguće je da će zbog organskog medija biti potrebno dodavanje odgovarajućeg pufera (natrijev hidrogenkarbonat ili kalijev dihidrogen fosfat) ako je niske kiselosti ili lužnatosti kako bi se tijekom testa pH u dozračnoj posudi održao na oko 7,5 ± 0,5. O količini pufera koju treba dodati te o trenutku dodavanja odlučuje se u svakom pojedinom slučaju. Kada se smjese dodaju neprekidno ili s prekidima, DOC (ili KPK) smjese mora se održavati na približno konstantnoj vrijednosti, npr. razrjeđivanjem vodom.

▼M4

Sintetičke otpadne vode

28. Po litri vode iz slavine otopi se: pepton, 160 mg; mesni ekstrakt, 110 mg; urea, 30 mg; anhidridni dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4), 28 mg; natrijev klorid (NaCl), 7 mg; kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; magnezijev sulfat heptahidrat ($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Te sintetičke otpadne vode OECD-a služe samo kao primjer i daju srednju koncentraciju DOC-a u ulaznoj vodi od oko 100 mg/l. Druga je mogućnost primjena drugih smjesa koje imaju otprilike jednaku koncentraciju DOC-a, a koje su sličnije pravim otpadnim vodama. Ako je potrebna ulazna voda slabije koncentracije, sintetičke otpadne vode se razrijede, primjerice u omjeru 1:1, vodom iz slavine kako bi se dobila koncentracija od oko 50 mg/l. Takva ulazna voda slabije koncentracije omogućit će bolji rast nitrifikacijskih organizama, a ta modifikacija trebala bi se primjenjivati ako se ispituje simulacija postrojenja za nitrifikaciju otpadnih voda. Te se sintetičke otpadne vode mogu napraviti u destiliranoj vodi u koncentriranom obliku i mogu se čuvati na oko 1 °C do tjedan dana. Po potrebi se razrijede vodom iz slavine. (Ovaj medij nije zadovoljavajući, npr. vrlo je visoka koncentracija dušika, relativno je nizak sadržaj ugljika, ali nije predloženo ništa bolje, osim da se doda više fosfata kao pufera i dodatnog peptona).

Komunalne otpadne vode

29. Koristite svježe istaložene otpadne vode koje se skupljaju svakodnevno iz postrojenja za pročišćavanje u koje se pretežno dovode komunalne otpadne vode. Njih treba prikupiti prije primarnog taloženja iz preljevnog kanala primarnog taložnika ili iz ulijeva postrojenja s aktivnim muljem te u njima uglavnom ne bi smjelo biti grubih čestica. Te se otpadne vode mogu koristiti nekoliko dana nakon skladištenja (općenito ne dulje od sedam dana) na oko 4 °C ako se dokaže da nije došlo do znatnijeg opadanja DOC-a (ili KPK-a) (npr. za manje od 20 %) tijekom skladištenja. Kako bi se ograničile smetnje u sustavu, trebalo bi prije uporabe prilagoditi DOC (ili KPK) svake nove šarže na odgovarajuću konstantnu vrijednost, npr. razrjeđivanjem vodom iz slavine.

Aktivni mulj

30. Prikupite aktivni mulj za inokulaciju iz aeracijskog bazena ispravnog postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili iz laboratorijske jedinice s aktivnim muljem, u kojoj se pretežno pročišćavaju komunalne otpadne vode.

Radne otopine ispitivane kemikalije

31. Za kemikalije odgovarajuće topljivosti pripremite radne otopine prikladnih koncentracija (npr. 1 do 5 g/l) u deioniziranoj vodi ili u mineralnom dijelu sintetičkih otpadnih voda (za netopljive i hlapljive kemikalije vidjeti Dodatak 5.). Odredite DOC i ukupni organski ugljik (TOC) radne otopine pa ponovite mjerenja za svaku novu šaržu. Ako je razlika između DOC-a i TOC-a veća od 20 %, provjerite topljivost u vodi ispitivane kemikalije. Usporedite DOC ili koncentraciju ispitivane kemikalije izmjerene specifičnom analizom radne otopine s nazivnom vrijednošću kako biste utvrdili je li oporavak dovoljno dobar (obično se može očekivati > 90 %). Utvrdite, posebno za disperzije, može li se ili ne DOC koristiti kao analitički parametar ili se može koristiti samo jedna analitička tehnika specifična za ispitivanu kemikaliju. Za disperziju je potrebna centrifuga uzoraka. Za svaku novu šaržu, specifičnom analizom izmjerite DOC, KPK ili ispitivanu kemikaliju.

▼M4

32. Odredite pH radne otopine. Ekstremne vrijednosti upućuju na to da dodavanje kemikalije možda utječe na pH aktivnog mulja u sustavu ispitivanja. U tom slučaju malim količinama anorganske kiseline ili lužine neutralizirajte radnu otopinu kako biste dobili pH od 7 ± 0,5, ali izbjegavajte taloženje ispitivane kemikalije.

POSTUPAK

33. Opisan je postupak za jedinice postrojenja s aktivnim muljem koji treba malo prilagoditi za sustav s propusnom posudom.

Priprema inokuluma

34. Na početku testa inokulirajte sustav ispitivanja bilo aktivnim muljem bilo inokulumom koji sadrži nisku koncentraciju mikroorganizama. Inokulum do uporabe treba odzračivati na sobnoj temperaturi i upotrijebite ga u roku od 24 h. U prvom slučaju uzmite uzorak aktivnog mulja iz aeracijskog bazena ispravnog postrojenja za pročišćavanje bioloških otpadnih voda ili laboratorijskog postrojenja za pročišćavanje u koje se pretežno dovode komunalne otpadne vode. Ako treba simulirati uvjete nitrifikacije, uzmite mulj iz postrojenja za pročišćavanje nitrificiranih otpadnih voda. Odredite koncentraciju suspendiranih krutih tvari te, ako je to potrebno, koncentrirajte mulj taloženjem tako da se ispitnom sustavu dodaje minimalna količina. Pobrinite se da početna koncentracija suhe tvari iznosi oko 2,5 g/l.

35. U drugom slučaju kao inokulum upotrijebite 2 ml/l do 10 ml/l izlazne vode iz postrojenja za pročišćavanje komunalnih bioloških otpadnih voda. Da biste dobili što je moguće veći broj različitih vrsta bakterija, može biti korisno dodati inokulum iz raznih drugih izvora, primjerice iz površinskih voda. U tom će se slučaju aktivni mulj razviti i rasti u sustavu ispitivanja.

Doziranje organskog medija

36. Pobrinite se da na početku i tijekom testa temeljito očistite spremnike ulazne i izlazne vode te cjevovode iz posude ulazne i posude izlazne vode kako biste uklonili nakupine mikroba. Sastavite sustav ispitivanja u prostoriji u kojoj se kontrolira temperatura (obično u rasponu od 20 – 25 °C) ili koristite ispitne jedinice s vodenim omotačem. Pripremite dovoljnu količinu potrebnog organskog medija (stavci 27. – 29.). Na početku napunite dozračnu posudu organskim medijem pa dodajte inokulum (stavci 34., 35.). Započnite dozračivanje tako da se mulj drži u suspenziji i u aerobnom stanju pa započnite doziranje ulazne vode i recirkulaciju istaloženog mulja. Organski medij dozirajte iz spremnika u dozračne posude (stavci 20., 21.) ispitne i kontrolne jedinice pa u slične spremnike skupite odgovarajuću izlaznu vodu. Kako bi se dobilo normalno vrijeme hidrauličkog zadržavanja od 6 h, organski se medij crpi brzinom od 0,5 l/h. Kako biste potvrdili tu brzinu, izmjerite dnevnu količinu doziranog organskog medija bilježenjem smanjenja volumena medija u spremnicima. Za određivanje učinaka ispuštanja s prekidima i „udarnog” dodavanja kemikalija bit će potrebni drugi načini doziranja.

37. Ako se organski medij priprema za uporabu tijekom razdoblja duljeg od 1 dana, potrebno je hlađenje na otprilike 4 °C ili neke druge prikladne metode konzerviranja kako bi se spriječio nastanak mikrobnih nakupina i biološka razgradnja izvan ispitnih jedinica (stavak 29.). Ako se koriste sintetičke otpadne vode, moguće je pripremiti i uskladištiti na otprilike 4 °C koncentriranu radnu otopinu (npr. koncentracije deset puta veće od normalne, stavak 28.). Ta se radna otopina prije uporabe može dobro miješati s odgovarajućom količinom vode iz slavine; druga je mogućnost izravno crpiti radnu otopinu dok se odgovarajuća količina vode iz slavine crpi zasebno.

▼M4

Doziranje ispitivane kemikalije

38. Dodajte odgovarajuću količinu radne otopine ispitivane kemikalije (stavak 31.) u spremnik ulazne vode ili je dozirajte izravno zasebnom crpkom u dozračnu posudu. Uobičajena srednja ispitna koncentracija ulazne vode trebala bi iznositi između 10 mg/l i 20 mg/l DOC-a, a krajnja gornja koncentracija ne iznosi više od 50 mg/l. Ako je niska topljivost u vodi ispitivane kemikalije ili ako postoji vjerojatnost pojave toksičnih učinaka, snizite koncentraciju DOC-a na 5 mg/l ili čak i manje, ali samo ako je raspoloživa i ako se primjenjuje odgovarajuća specifična analitička metoda (dispergirane ispitivane kemikalije koje se slabo tope u vodi mogu se dodavati posebnim tehnikama doziranja, vidjeti Dodatak 5.).

39. Započnite s dodavanjem ispitivane kemikalije po isteku razdoblja tijekom kojega se sustav stabilizirao i kada učinkovito uklanja DOC organskog medija (oko 80 %). Vrlo je važno prije dodavanja ispitivane kemikalije provjeriti rade li sve jedinice podjednako učinkovito; ako to nije slučaj, obično pomaže miješanje pojedinih muljeva i dodavanje jednake količine u pojedine jedinice. Kada se koristi inokulum od (otprilike) 2,5 g/l (suhe mase) aktivnog mulja, ispitivana kemikalija može se dodavati od samog početka testa jer je prednost izravnog dodavanja sve većih količina od početka ta da se aktivni mulj može bolje prilagoditi ispitivanoj kemikaliji. Bez obzira na način dodavanja ispitivane kemikalije, preporučuje se da se u redovnim razmacima mjere relevantna brzina protoka i/ili količine u spremniku/spremnicima.

Rukovanje aktivnim muljem

40. Koncentracija krutih tvari u aktivnom mulju obično se tijekom testa stabilizira unutar granica, neovisno o vrsti upotrijebljenog inokuluma, u rasponu od 1 do 3 g/l (suha masa), ovisno o kakvoći i koncentraciji organskog medija, radnim uvjetima, naravi prisutnih mikroorganizama i utjecaju ispitivane kemikalije.

41. Odredite suspendirane krute tvari u dozračnim posudama najmanje jedanput tjedno i izdvojite višak mulja kako biste koncentraciju održali na 1 g/l do 3 g/l (suhe mase) ili održavajte srednju starost mulja na konstantnoj vrijednosti, obično u rasponu od 6 do 10 dana. Ako se odabere, primjerice, vrijeme zadržavanja mulja od osam dana, svakodnevno uklonite 1/8 količine aktivnog mulja iz dozračne posude i to bacite. Provodite to svakodnevno ili, po mogućnosti, pomoću automatske crpke koja radi s prekidima. Održavanjem koncentracije suspendiranih krutih tvari konstantnom ili unutar uskih granica ne održavate konstantnim vrijeme zadržavanja mulja (SRT), što je radna varijabla koja određuje vrijednost koncentracije ispitivane kemikalije u izlaznoj vodi.

42. Tijekom cijelog testa najmanje jedanput dnevno uklonite sav mulj koji se prilijepi na stjenke dozračne posude i separatora tako da se ponovno suspendira. Redovito pregledavajte i čistite sve cijevi i cjevovode kako biste spriječili razvoj biofilma. Reciklirajte istaloženi mulj iz separatora u dozračnu posudu, po mogućnosti crpljenjem s prekidima. U sustavu s propusnom posudom nema recikliranja, ali se pobrinite da su čiste unutarnje posude umetnute prije nego što količina u posudi znatno naraste (stavak 21.).

43. U Husmannovim jedinicama postrojenja može doći do slabog taloženja i gubitka mulja. To se može popraviti provođenjem jedne ili većeg broja dolje navedenih mjera, istodobno i u ispitnoj i u kontrolnoj jedinici:

— svježi mulj ili flokulant (primjerice 2 ml/posudi od 50 g/l $FeCl_3$) mogu se dodavati u redovitim razmacima, npr. svakog tjedna, ali osigurajte da ne dođe do reakcije ili precipitacije ispitivane kemikalije i $FeCl_3$;

▼M4

— „air-lift” crpka može se zamijeniti peristaltičkom crpkom, omogućujući tako protok mulja pri recirkulaciji približno jednak protoku ulazne vode koji se treba koristiti te omogućujući razvoj anaerobne zone u istaloženom mulju (geometrijom „air-lift” crpke minimalna brzina protoka vraćenog mulja ograničena je na otprilike dvanaestorostruku brzinu protoka ulazne vode);

— mulj se može crpiti s prekidima iz separatora u dozračnu posudu (npr. 5 min. svakih 2,5 h za recirkulaciju 1 l/h do 1,5 l/h;

— može se koristiti netoksično sredstvo protiv pjenjenja u minimalnoj koncentraciji kako bi se spriječio gubitak pjenjenjem (npr. silikonsko ulje);

— kroz mulj u separatoru može se puštati zrak u kratkim, udarnim mlazovima (npr. 10 s svakih sat vremena);

— organski se medij može dozirati u razmacima u dozračnu posudu (npr. 3 min. do 10 min. svakih sat vremena).

Uzorkovanje i analiza

44. U redovnim razmacima izmjerite koncentraciju otopljenog kisika, temperaturu i pH aktivnog mulja u dozračnim posudama. Pobrinite se da uvijek ima dovoljno kisika (> 2 mg/l) i da se temperatura održava u traženom rasponu (obično 20 °C do 25 °C). Održavajte pH na 7,5 ± 0,5 doziranjem malih količina anorganske lužine ili kiseline u dozračnu posudu ili u ulaznu vodu ili povećanjem puferskog kapaciteta organskog medija (vidjeti stavak 27.). Kada dođe do nitrifikacije, nastaje kiselina, a oksidacija 1 mg N proizvodi otprilike 7 mg CO_3^{--}. Učestalost mjerenja ovisi o parametrima koje treba izmjeriti i o stabilnosti sustava, a dnevna i tjedna mjerenja mogu se razlikovati.

45. Izmjerite DOC ili KPK u ulaznoj vodi koja se ulijeva u kontrolnu i ispitnu posudu. Koncentraciju ispitivane kemikalije u ispitnoj ulaznoj vodi izmjerite specifičnom analizom ili je procijenite na temelju koncentracije u radnoj otopini (stavak 31.), upotrijebljenog volumena i količine otpadnih voda koja se dozira u ispitnu jedinicu. Preporučuje se izračunati koncentraciju ispitivane kemikalije da bi se smanjila varijabilnost podataka o koncentraciji.

46. Uzmite odgovarajuće uzorke iz skupljene izlazne vode (npr. smjese koje stoje 24 h) i filtrirajte ih kroz membranu veličine pora 0,45 μm ili ih centrifugirajte na oko 40 000 m/s^2 otprilike 15 min. Centrifugiranje se koristi ako je teško provesti filtraciju. Odredite DOC ili KPK najmanje dvaput za svaki uzorak kako biste izmjerili potpunu biorazgradnju te, ako je to potrebno, za primarnu biorazgradnju analizom specifičnom za ispitivanu kemikaliju.

47. Uporaba KPK-a može izazvati analitičke probleme na niskim koncentracijama, stoga se ona preporučuje jedino ako se koristi dovoljno visoka ispitna koncentracija (oko 30 mg/l). Za kemikalije koje dobro adsorbiraju preporučuje se i mjerenje količine adsorbirane kemikalije u mulju pomoću analitičke tehnike specifične za ispitivanu kemikaliju.

48. Učestalost uzorkovanja ovisi o očekivanom trajanju testa. Preporučuje se učestalost tri puta tjedno. Kada jedinice počnu učinkovito raditi, pričekajte od jednog tjedna do maksimalno šest tjedana nakon dodavanja ispitivane kemikalije za njezinu prilagodbu i postizanje stabilnog stanja. Po mogućnosti odredite najmanje 15 valjanih vrijednosti u stacionarnoj fazi (stavak 59.) koja obično traje tri tjedna, za evaluaciju rezultata ispitivanja. Test se može završiti ako se postigne zadovoljavajući stupanj eliminacije (npr. > 90 %) i ako je dostupno tih 15 vrijednosti koje predstavljaju analize provedene svakog radnog dana tijekom tri tjedna. Obično test ne treba trajati duže od 12 tjedana nakon dodavanja ispitivane kemikalije.

▼M4

49. Ako se mulj nitrificira i ako treba proučiti utjecaje ispitivane kemikalije na nitrifikaciju, analizirajte prisutnost amonijaka i/ili nitrita plus nitrata u uzorcima izlazne vode iz ispitne i kontrolne jedinice najmanje jedanput tjedno.

50. Sve analize treba provoditi što je prije moguće, posebno određivanja dušika. Ako se analize moraju odgoditi, uskladištite uzorke na oko 4 °C na tamnom mjestu u do vrha napunjenim i čvrsto zatvorenim bocama. Ako se uzorci moraju skladištiti dulje od 48 h, konzervirajte ih dubokim smrzavanjem, acidifikacijom (npr. 10 ml/l otopine sumporne kiseline od 400 g/l) ili dodavanjem odgovarajuće toksične tvari (npr. 20 ml/l otopine merkurijeva (II) klorida od 10 g/l). Pobrinite se da tehnika konzerviranja ne utječe na rezultate analize.

Povezivanje ispitnih jedinica

51. Ako treba primijeniti rad s povezanim jedinicama (Dodatak 3.), svakodnevno zamijenite istu količinu aktivnog mulja (150 ml do 1 500 ml za dozračne posude koje sadržavaju tri litre suspenzije) iz dozračnih posuda ispitne jedinice i njezine kontrolne jedinice. Ako se ispitivana kemikalija jako adsorbira na mulj, promijenite samo supernatant u separatoru. U oba slučaja koristite se faktorom korekcije za izračun rezultata ispitivanja (stavak 55.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

52. Izračunajte postotak eliminacije DOC-a ili KPK-a ispitivane kemikalije za svaku vremenski određenu procjenu pomoću sljedeće jednadžbe:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

gdje je

D_t = % eliminacija DOC-a ili KPK-a u vremenu t

C_s = DOC ili KPK u ulaznoj vodi nastao zbog ispitivane kemikalije, procijenjen po mogućnosti iz radne otopine (mg/l)

E = izmjerena vrijednost DOC-a ili KPK-a u ispitnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l)

E_o = izmjerena vrijednost DOC-a ili KPK-a u kontrolnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l)

53. Stupanj eliminacije DOC-a ili KPK-a organskog medija u kontrolnoj jedinici korisna je informacija pri procjeni aktivnosti biorazgradnje aktivnog mulja tijekom testa. Postotak eliminacije izračunajte pomoću jednadžbe:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

gdje je

D_B = % eliminacije DOC-a ili KPK-a organskog medija u kontrolnoj jedinici u vremenu t

C_M = DOC ili KPK organskog medija u kontrolnoj ulaznoj vodi (mg/l)

▼M4

Prema potrebi izračunajte postotak eliminacije DOC-a ili KPK-a nastale zbog organskog medija plus ispitivane kemikalije u ispitnoj jedinici pomoću jednadžbe:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

gdje je

D_T = % eliminacije DOC-a ili KPK-a u ukupnoj ispitnoj ulaznoj vodi

C_T = DOC ili KPK ukupne ispitne ulazne vode ili izračunato iz radnih otopina (mg/l)

54. Izračunajte opadanje ispitivane kemikalije ako se to mjerilo specifičnom analitičkom metodom u svakom vremenski određenom određivanju iz jednadžbe:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

gdje je

D_{ST} = % primarne eliminacije ispitivane kemikalije u vremenu t

S_i = izmjerena ili procijenjena koncentracija ispitivane kemikalije u ispitnoj ulaznoj vodi (mg/l)

S_e = izmjerena koncentracija ispitivane kemikalije u isptnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l)

55. Ako se koristio način rada „s povezanim jedinicama”, kompenzirajte otapanje ispitivane kemikalije u dozračnoj posudi zamjenom mulja putem faktora korekcije (vidjeti Dodatak 3.). Ako se koristi srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja od 6 h i zamjena polovine volumena aktivnog mulja u dozračnoj posudi, određene dnevne vrijednosti eliminacije (D_t, stavak 52.) moraju se korigirati kako bi se dobio pravi stupanj eliminacije, D_{tc}, ispitne kemikalije iz jednadžbe:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Izražavanje rezultata ispitivanja

56. Grafički prikažite postotak eliminacije D_t (ili D_{tc}) i D_{st}, ako imate te vrijednosti, u ovisnosti o vremenu (vidjeti Dodatak 2.). Iz oblika krivulje eliminacije ispitivane kemikalije (*per se* ili kao DOC) mogu se izvući određeni zaključci o procesu opadanja.

Adsorpcija

57. Ako se od početka testa zamijeti velika eliminacija DOC-a ispitivane kemikalije, ispitivana kemikalija se najvjerojatnije eliminira adsorpcijom na krute tvari u aktivnom mulju. To je moguće i dokazati određivanjem adsorbirane ispitivane kemikalije specifičnom analizom. Nije uobičajeno da eliminacija DOC-a kemikalija koje se mogu adsorbirati ostane visoka tijekom cijelog testa; obično je u početku visok stupanj opadanja, ali isti postupno pada do neke uravnotežene vrijednosti. Međutim, ako je ispitivana kemikalija koja se može adsorbirati mogla izazvati aklimatizaciju mikrobne populacije na ovaj ili onaj način, eliminacija DOC-a ispitivane kemikalije naknadno bi porasla i postigla visoku vrijednost platoa (stabilno stanje).

▼M4

Faza prilagodbe

58. Kao i u statičkim testovima probira, za brojne je ispitivane kemikalije potrebna faza prilagodbe prije nego što dođe do potpune biorazgradnje. U fazi prilagodbe odvija se aklimatizacija ili prilagodba bakterija koje se razgrađuju, pri čemu ispitivana kemikalija gotovo uopće ne opada, a potom dolazi do početnog rasta tih bakterija. Ta faza završava, a smatra se da faza razgradnje započinje nakon što opadne otprilike 10 % početne količine ispitivane kemikalije (nakon što se odvoji dovoljno vremena za adsorpciju, ako se ona događa). Faza prilagodbe često je krajnje varijabilna i slabo se može mjerno obnoviti.

Stacionarna faza

59. Stacionarna faza krivulje eliminacije u neprekidnom testu definira se kao faza u kojoj dolazi do maksimalne razgradnje. Stacionarna faza trebala bi trajati najmanje tri tjedna i imati oko 15 izmjerenih valjanih vrijednosti.

Srednji stupanj eliminacije ispitivane kemikalije

60. Izračunajte srednju vrijednost iz vrijednosti eliminacije (D_t) ispitivane kemikalije u stacionarnoj fazi. Zaokružite na najbliži cijeli broj (1 %) i dobit ćete stupanj eliminacije ispitivane kemikalije. Također se preporučuje da se izračuna i 95 % intervala pouzdanosti srednje vrijednosti.

Eliminacija organskog medija

61. Grafički prikažite postotak eliminacije DOC-a ili KPK-a organskog medija u kontrolnoj jedinici (D_B) u ovisnosti o vremenu. Označite srednji stupanj eliminacije na isti način kao i za ispitivanu kemikaliju (stavak 60.).

Navođenje biorazgradnje

62. Ako se ispitivana kemikalija ne adsorbira znatno na aktivni mulj i ako krivulja eliminacije ima tipičan oblik krivulje biorazgradnje s fazama prilagodbe, razgradnje i stacionarnom fazom (stavci 58., 59.), izmjerena eliminacija može se sa sigurnošću pripisati biorazgradnji. Ako dođe do velikog početnog opadanja, simulacijskim testom ne mogu se razlikovati procesi biološke i abiotičke eliminacije. U takvom slučaju, ali i u svim drugim slučajevima u kojima postoji bilo kakva dvojba o biorazgradnji (npr. ako dođe do ljuštenja), analizirajte adsorbiranu ispitivanu kemikaliju ili provedite dodatne testove statičke biorazgradnje na temelju parametara koji jasno označuju biološke procese. Takvi su testovi metode utroška kisika (poglavlje C.4 D, E i F ovog Priloga (6)) ili test mjerenja proizvodnje ugljikova dioksida (poglavlje C.4 C ovog Priloga (6)) ili ISO-ova Headspace metoda (plinski prostor) (18), u kojima se koristi prethodno izloženi inokulum iz simulacijskog testa. Ako se izmjere i opadanje DOC-a i opadanje specifične kemikalije, znatne razlike (pri čemu je prva vrijednost niža od druge) među postocima opadanja naznačuju prisutnost u izlaznoj vodi intermedijarnih organskih proizvoda koji se možda teže razgrađuju od polazne kemikalije.

Valjanost rezultata ispitivanja

63. Podaci o ponašanju inokuluma pri normalnoj biorazgradnji dobivaju se ako se odredi stupanj eliminacije organskog medija (stavak 53.) u kontrolnoj jedinici. Test se može smatrati valjanim ako je stupanj eliminacije DOC-a ili KPK-a u kontrolnoj jedinici/jedinicama > 80 % nakon dva tjedna i nema neuobičajenih primjedbi.

▼M4

64. Ako se upotrebljavala lako biorazgradiva (referentna) kemikalija, stupanj biorazgradnje (D_t, stavak 52.) trebao bi biti > 90 %.

65. Ako se test provodi u uvjetima nitrifikacije, srednja koncentracija u izlaznoj vodi trebala bi biti < 1 mg/l amonija-N i < 2 mg/l nitrita-N.

66. Ako nisu ispunjeni ti kriteriji (stavci 63. – 65.), ponovite test korištenjem inokuluma iz nekog drugog izvora, ispitajte referentnu kemikaliju i revidirajte sve pokusne postupke.

Izvješće o ispitivanju

67. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće:

Ispitivana kemikalija:

— podaci za identifikaciju;

— fizikalno stanje i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva.

Uvjeti ispitivanja:

— vrsta sustava za ispitivanje; sve modifikacije za ispitivanje netopljivih i hlapljivih kemikalija,

— vrsta organskog medija,

— udio i narav industrijskih otpadnih voda u otpadnim vodama, ako je poznato,

— inokulum, stanje i mjesto/mjesta uzorkovanja, koncentracija i svaka prethodna obrada,

— radna otopina ispitivane kemikalije: sadržaj DOC-a i TOC-a; kako je pripremljena, ako je riječ o suspenziji; upotrijebljena ispitna koncentracija; obrazloženje ako je vanjski raspon 10-20 mg/l DOC-a; metoda dodavanja; datum prvog dodavanja, sve promjene,

— srednja starost mulja i srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja; metoda izdvajanja mulja; metode savladavanja bubrenja, gubitka mulja itd.,

— primijenjene analitičke tehnike,

— ispitna temperatura;

— kakvoća bubrenja mulja, indeks volumena mulja (SVI), suspendirane tvari iz miješane suspenzije (MLSS);

— sve devijacije od standardnih postupaka i sve okolnosti koje su možda utjecale na rezultate.

Rezultati ispitivanja:

— svi izmjereni podaci (DOC, KPK, specifične analize, pH, temperatura, koncentracija kisika, suspendirane krute tvari, dušikovi spojevi, ako je relevantno,

— sve izračunate vrijednosti D_t (ili D_{tc}), D_B, D_{St} dobivene u tabličnom obliku i krivuljama eliminacije.

— podaci o fazi prilagodbe i stacionarnoj fazi, trajanju testa, stupnju eliminacije ispitivane kemikalije i organskog medija u kontrolnoj jedinici, zajedno sa statističkim podacima i izjavama o biorazgradivosti i valjanosti testa;

— rasprava o rezultatima.

▼**M4**

LITERATURA

1. Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, str. 1085.

2. German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

3. Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4. Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

5. Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6. Poglavlje C.4 ovog Priloga, Određivanje „lake” biorazgradivosti.

7. Poglavlje C.12 ovog Priloga, Biorazgradivost - izmijenjeni test SCAS.

8. Poglavlje C.19 ovog Priloga, Procjena koeficijenta adsorpcije (K_{OC}) na tlu i na mulju iz otpadnih voda pomoću visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC).

9. Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

10. Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

11. Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. str. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12. ISO 11733 (1995; revidirano 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

13. Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

14. Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

15. Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

16. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

17. Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. str. 91-98 ISBN 011 751661 9.

18. ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

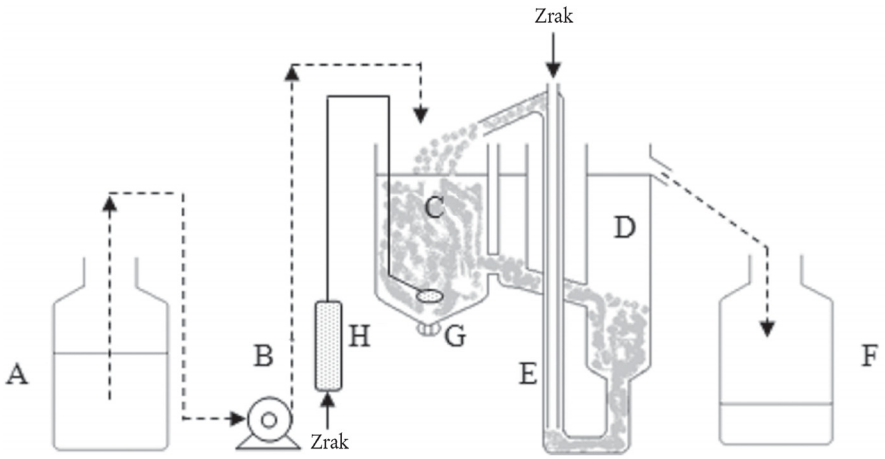
▼M4

Dodatak 1.

Slika 1.

Oprema koja se koristi za procjenu biorazgradivosti

Husmannova jedinica



A. Spremnik

B. Dozirna crpka

C. Dozračna komora (zapremine 3 l)

D. Taložnik

E. „Air-lift” crpka

F. Sabirna posuda

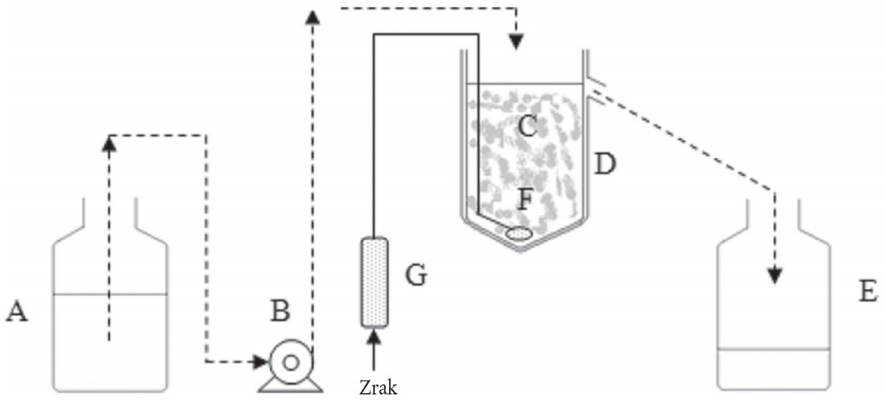
G. Dozračnik

H. Mjerač protoka zraka

Slika 2.

Oprema koja se koristi za procjenu biorazgradivosti

Propusna posuda



A. Spremnik

B. Dozirna crpka

C. Propusna dozračna posuda

D. Vanjska nepropusna posuda

E. Sabirna posuda

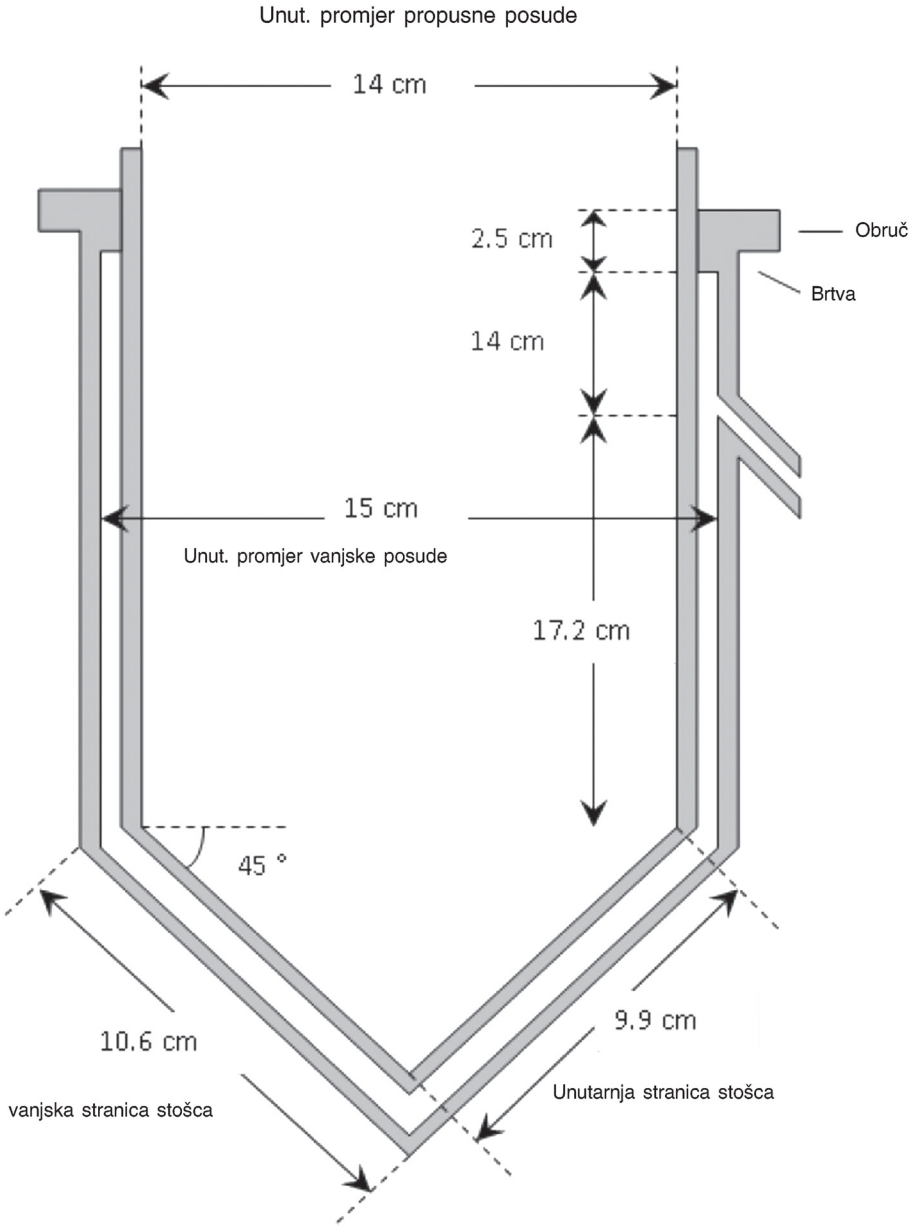
F. Difuzor

G. Mjerač protoka zraka

▼**M4**

Slika 3.

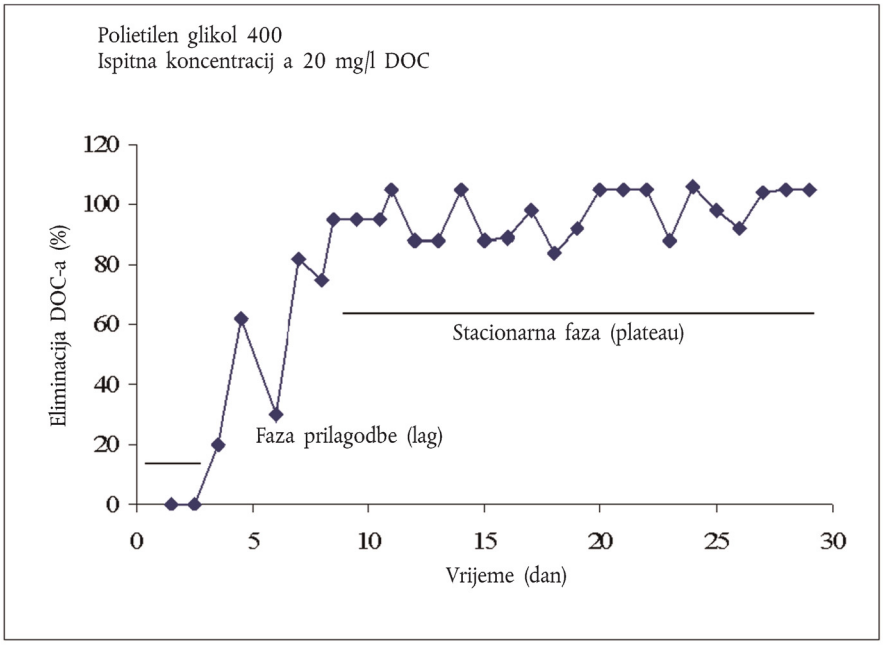
Podaci o dozračnoj posudi propusne posude od 3 litre



▼**M4**

Dodatak 2.

Primjer krivulje eliminacije



▼M4

Dodatak 3.

[INFORMATIVNO]

POVEZIVANJE ISPITNIH JEDINICA

Da bi se pokušalo ujednačiti mikrobnu populaciju u muljevima u ispitnoj jedinici, u koju se dodaju otpadne vode plus ispitivana kemikalija, te u kontrolnoj jedinici u koju se dodaju samo otpadne vode, uvedena je svakodnevna izmjena mulja (1). Taj se postupak naziva povezivanje, a metoda je poznata kao „povezane jedinice". Povezivanje se na početku provodilo pomoću Husmannovih jedinica s aktivnim muljem, ali se provodilo i s jedinicama s propusnom posudom (2)(3). Između nepovezanih i povezanih jedinica, bilo Husmannovih jedinica bilo propusnih posuda, nisu pronađene nikakve značajnije razlike tako da utrošak vremena i energije potreban pri povezivanju jedinica ovdje nema nikakvu prednost.

Može se činiti da se izmjenom mulja postiže znatno opadanje jer se sve više izjednačuju neke od ispitivanih kemikalija u transferiranju i koncentracijama ispitivane kemikalije u ispitnoj i kontrolnoj izlaznoj vodi. Dakle, moraju se primijeniti faktori korekcije, koji ovise o izmijenjenom dijelu i srednjem vremenu hidrauličkog zadržavanja. O tom je izračunu objavljeno više pojedinosti (1).

Izračunajte korigirani stupanj eliminacije DOC-a ili KPK-a pomoću opće formule:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

gdje je

D_{tc} = korigirani % eliminacije DOC-a ili KPK-a

D_t = određeni % eliminacije DOC-a ili KPK-a

a = dio zamijenjenog volumena jedinica s aktivnim muljem

r = srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja (h)

Ako se, primjerice, zamijeni pola volumena aeracijskog bazena (a = 0,5), a srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja 6h, korekcijska formula glasi:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATURA

1. Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

2. Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. str. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3. Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Dodatak 4.

VREDNOVANJE INHIBICIJE AKTIVNOG MULJA

Proces pomoću ispitivanih kemikalija

1. Kemikalija (ili otpadne vode) ne mogu se razgraditi ni opasti u simulacijskom testu, a mogu imati čak i inhibitorni učinak na mikroorganizme u aktivnom mulju. Ostale se kemikalije biorazgrađuju na niskim koncentracijama, ali u višim koncentracijama (hormeza) imaju inhibitorni učinak. Inhibitorni se učinci mogu otkriti i u ranijoj fazi ili se mogu odrediti testom toksičnosti pomoću inokuluma sličnog onomu koji se koristio u simulacijskom testu (1). Te su metode inhibicija potrošnje kisika (poglavlje C.11 ovog Priloga (2) i ISO 8192(3)) ili inhibicija rasta organizama u aktivnom mulju (ISO 15522 (4)).

2. U simulacijskom će se testu sve inhibicije očitovati u različitom sadržaju otopljenog organskog ugljika (DOC) ili kemijske potrošnje kisika (KPK) u izlaznoj vodi iz ispitne posude i izlaznoj vodi iz kontrolne posude, koji je veći od DOC-a dodanog u vidu ispitivane kemikalije. Drugim riječima, postotak opadanja DOC-a (i biokemijske potrošnje kisika BPK, kemijske potrošnje kisika KPK, i/ili NH^{+}_{4}) organskog medija bit će smanjen tijekom pročišćavanja prisustvom ispitivane kemikalije. Ako se to dogodi, test treba ponoviti sa smanjenom koncentracijom ispitivane kemikalije sve dok se ne postigne razina na kojoj ne dolazi do inhibicije te možda i daljnjim smanjivanjem koncentracije sve dok se ispitivana kemikalija ne razgradi. Međutim, ako ispitivana kemikalija (ili otpadna voda) imaju štetan učinak na proces bez obzira na sve ispitne koncentracije, to je znak da je tu kemikaliju teško, ako ne i nemoguće, biološki pročistiti, već možda ima više smisla ponoviti test aktivnim muljem iz nekog drugog izvora i/ili podvrgnuti mulj postupnijoj aklimatizaciji.

3. I obratno: ako se ispitivana kemikalija eliminira biološkim pročišćavanjem u prvom simulacijskom testu, trebalo bi povisivati njezinu koncentraciju ako se mora saznati ima li ta kemikalija inhibitorni učinak.

4. U nastojanjima određivanja stupnjeva inhibicije treba imati na umu da se populacija u aktivnom mulju može promijeniti tako da s vremenom mikroorganizmi mogu razviti toleranciju na inhibitornu kemikaliju.

5. Izračun stupnja inhibicije:

   Ukupni postotak opadanja R_o BPK-a, DOC-a, KPK-a itd. za ispitnu i kontrolnu jedinicu može se izračunati iz:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

   gdje je:

   I = koncentracija u ulaznoj vodi BPK-a, DOC-a, KPK-a itd. za ispitnu ili kontrolnu posudu (mg/l)

   E = odgovarajuće koncentracije u izlaznoj vodi (mg/l).

   I i E moraju se korigirati po pitanju DOC-a nastalog zbog ispitivane kemikalije u ispitnim jedinicama, u protivnom će izračuni postotka inhibicije biti netočni.

▼**M4**

Stupanj inhibicije koji izaziva prisustvo ispitivane kemikalije može se izračunati iz:

$$\% \text{ inhibicije} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

gdje je:

R_c = postotak opadanja u kontrolnim posudama

R_t = postotak opadanja u ispitnim posudama

LITERATURA

1. Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2. Poglavlje C.12 ovog Priloga, Biorazgradivost - test inhibicije disanja aktivnog mulja.

3. ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4. ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatak 5.

Ispitivane kemikalije slabo topljive u vodi - hlapljive kemikalije

Kemikalije slabo topljive u vodi

Objavljeno je vrlo malo izvješća o podvrgavanju kemikalija slabo topljivih u vodi i netopljivih kemikalija testovima koji simuliraju pročišćavanje otpadnih voda (1)(2)(3).

Nema jedinstvene metode dispergiranja ispitivane kemikalije koja bi se mogla primijeniti na sve netopljive kemikalije. Čini se da bi dvije od četiri metode opisane u normi ISO 10634 (4) bile prikladne za pokušaj dispergiranja ispitivanih kemikalija za simulacijske testove, a to su uporaba emulgatora i/ili ultrazvučne energije. Treba utvrditi stabilnost tako nastale disperzije u razdoblju od najmanje 24 h. Prikladno stabilizirane disperzije, sadržane u spremniku u kojemu se neprekidno miješaju (stavak 38.), potom se doziraju u aeracijski bazen, a zasebno se dodaju komunalne (ili sintetičke) otpadne vode.

Ako su disperzije stabilne, ispitajte na koji se način može odrediti ispitivana kemikalija u raspršenom obliku. DOC vjerojatno neće biti prikladan pa bi trebalo pronaći specifičnu analitičku metodu za ispitivanu kemikaliju koja bi se mogla primijeniti na otpadne vode, krute tvari iz otpadnih voda i aktivni mulj. Potom se određuje sudbina ispitivane kemikalije u simulaciji procesa aktivnog mulja, i to u tekućem i krutom stanju. Potom se utvrđuje „bilanca mase” kako bi se odlučilo je li došlo do biorazgradnje ispitivane kemikalije. Međutim, time bi se navela samo primarna biorazgradnja. Trebalo bi pokušati pokazati i potpunu biorazgradnju primjenom respirometrijskog testa lake biorazgradivosti (poglavlje C.4 ovog Priloga (5) C, F ili D) koristeći kao inokulum mulj izložen ispitivanoj kemikaliji u simulacijskom testu.

Hlapljive kemikalije

Primjena simulacija pročišćavanja otpadnih voda na hlapljive kemikalije podložna je raspravi i problematična. Kao i sa kemikalijama slabo topljivima u vodi, objavljeno je vrlo malo izvješća u kojima se opisuju simulacijski testovi u kojima se koriste hlapljive kemikalije. Konvencionalni tip aparature za potpuno miješanje prilagođava se zatvaranjem aeracijskog bazena i taložnika, mjerenjem i kontroliranjem protoka zraka pomoću mjerača protoka i propuštanjem izlaznog plina kroz odvajače kako bi se skupila hlapljiva organska tvar. U nekim se slučajevima koristi i vakuumska crpka za crpljenje izlaznog plina kroz „hladni” odvajač ili odvajač ispiranjem koji sadržava Tenax i silikonski gel za analize plinskom kromatografijom. Ispitivana kemikalija prisutna u odvajaču može se analitički odrediti.

Test se provodi u dva dijela. Jedinice se prvo pogone bez mulja, ali se sintetičke otpadne vode plus ispitivana kemikalija crpe u aeracijski bazen. Nekoliko se dana skupljaju ulazna i izlazna voda i izlazni plin i analiziraju se na ispitivanu kemikaliju. Iz prikupljenih podataka može se izračunati postotak (R_{vs}) kemikalije oguljene iz sustava.

Potom se provodi uobičajeni biološki test (s muljem) čiji su radni uvjeti identični onima u studiji ljuštenjem. Mjere se i DOC i KPK da bi se provjerilo rade li jedinice ispravno. U prvom se dijelu testa provode i povremene analize da bi se odredila ispitivana kemikalija u ulaznoj vodi, izlaznoj vodi i izlaznom plinu, a nakon aklimatizacije provode se češće analize. I opet se iz podataka u stabilnom stanju može izračunati postotak opadanja ispitivane kemikalije iz tekućeg stanja svim procesima (R_T) (fizikalnim i biološkim), kao i udio (R_V) oguljen iz sustava.

▼**M4**

Izračun:

(a) U nebiološkom testu može se izračunati postotak ((R_{VP}) ispitivane tvari oguljene iz sustava iz:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

gdje je

R_{VP} = opadanje ispitivane kemikalije hlapljenjem (%),

S_{VP} = ispitivana kemikalija skupljena u odvajaču izražena kao ekvivalentna koncentracija u tekućem stanju (mg/l),

S_{IP} = koncentracija ispitivane kemikalije u ulaznoj vodi (mg/l).

(b) U biološkom testu može se izračunati postotak (R_V) ispitivane tvari oguljene iz sustava iz:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

gdje je

R_V = opadanje ispitivane kemikalije hlapljenjem u biološkom testu (%),

S_V = ispitivana kemikalija skupljena u odvajaču u biološkom testu izražena kao ekvivalentna koncentracija u tekućoj ulaznoj vodi (mg/l),

S_I = koncentracija ispitivane kemikalije u ulaznoj vodi (mg/l).

(c) U biološkom testu dan je postotak (R_T) ispitivane kemikalije koja opada u svim procesima:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

gdje je

S_E = koncentracija ispitivane kemikalije u (tekućoj) izlaznoj vodi (mg/l).

(d) Tako se postotak (R_{BA}) koji je opao u biorazgradnji plus adsorpciji može izračunati iz:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Trebalo bi provesti zasebne testove da se odredi adsorbira li se ispitivana kemikalija; ako je to slučaj, može se provesti daljnja korekcija.

(e) Usporedba omjera ispitivane kemikalije oljuštene u sustavima biološkog (R_v) i nebiološkog testa (R_{vp}) navodi opći učinak koji je biološko pročišćavanje imalo na emisiju ispitivane kemikalije u atmosferu.

Primjer: Benzen

Vrijeme zadržavanja mulja = 4 dana

Sintetičke otpadne vode; vrijeme zadržavanja = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Tako je

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % i R_{BA} = 85 %.

Pretpostavlja se da se benzen ne adsorbira na mulj.

LITERATURA

1. Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
2. Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
3. Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
4. ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
5. Poglavlje C.4 ovog Priloga, Određivanje „Lake” Biorazgradivosti.

▼M4

Dodatak 6.

Učinci vremena zadržavanja mulja (SRT) na pročistivost kemikalija

UVOD

1. Metoda opisana u glavnom dijelu teksta namijenjena je da se odredi može li se ispitivana kemikalija (obično ona kojoj je svojstvena biorazgradivost, ali koja se ne biorazgrađuje lako) biorazgraditi unutar ograničenja nametnutih u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Rezultati se izražavaju u kategorijama postotka opadanja i postotka biorazgradnje. Uvjeti rada jedinica s aktivnim muljem i odabir ulazne vode omogućuju prilično velike varijacije u koncentraciji ispitivane kemikalije u izlaznoj vodi. Testovi se provode samo na jednoj nazivnoj koncentraciji krutih tvari u mulju ili jednom nazivnom vremenu zadržavanja mulja (SRT), a opisani režimi izdvajanja mulja mogu izazvati velike varijacije vrijednosti SRT-a tijekom testa, kako u različitim danima tako i tijekom istog dana.

2. U ovoj se varijanti (1)(2) SRT kontrolira unutar znatno užih ograničenja tijekom razdoblja od 24h (baš kao i u postrojenju velikih razmjera), što rezultira konstantnijom koncentracijom u izlaznoj vodi. Preporučuju se komunalne otpadne vode jer one pokazuju dosljedniji i viši postotak opadanja. Isto tako, ispituju se učinci cijelog niza vrijednosti SRT-a, a u još detaljnijoj studiji mogu se odrediti i učinci raspona temperatura na koncentraciju u izlaznoj vodi.

3. Međutim, još uvijek nije postignut opći dogovor o tome koji kinetički modeli funkcioniraju kada se kemikalije biorazgrađuju u uvjetima postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Odabrali smo na prikupljene podatke primijeniti Monodov model rasta bakterija i primjene supstrata (1)(2) jer se namjeravalo tu metodu primijeniti samo na kemikalije koje se proizvode u velikim količinama, što rezultira koncentracijama u otpadnim vodama iznad 1 mg/l. Valjanost ovog pojednostavljenog modela i pretpostavke od kojih se krenulo uveli su se pomoću niza alkoholnih etoksilata s različitim stupnjevima primarne biorazgradivosti (2)(3).

Napomena. Ova varijanta metode počiva dobrano na tekstu ispitne metode C.10-A, a u nastavku teksta navedeno je samo ono u čemu se te metode razlikuju.

NAČELO ISPITIVANJA

4. Jedinice s propusnom posudom za aktivni mulj, namijenjene za olakšavanje (gotovo) neprekidnog izdvajanja miješane suspenzije što omogućuje vrlo preciznu kontrolu vremena zadržavanja mulja (SRT ili θ_s), pogone se u načinu rada ‚s nepovezanim jedinicama' tijekom nekoliko SRT-a te, proizvoljno, još i na nizu različitih temperatura. Vrijeme zadržavanja obično iznosi 2 do 10 dana, a temperatura između 5 i 20 °C. Otpadne vode, po mogućnosti komunalne, i otopina ispitivane kemikalije doziraju se zasebno u jedinice onom brzinom koja daje potrebno vrijeme zadržavanja otpadnih voda (3 do 6 sati) i potrebnu koncentraciju ispitivane kemikalije u ulaznoj vodi. Kontrolne jedinice u koje se ne dodaje ispitivana kemikalija pogone se paralelno u poredbene svrhe.

5. Mogu se koristiti i druge vrste aparature, ali treba se vladati s krajnjom pažnjom kako bi se osiguralo postizanje dobre kontrole SRT-a. Primjerice, kada se koristi postrojenjima, koja sadrže i taložnik, možda će biti potrebno predvidjeti gubitak krutih tvari putem izlazne vode iz postrojenja. Nadalje, moraju se također poduzeti i posebne mjere opreza kako bi se izbjegle greške zbog varijacije količine mulja u taložniku.

▼M4

6. Jedinice se pogone u svakom odabranom nizu uvjeta, a kada se postigne ravnoteža, tijekom razdoblja od otprilike tri tjedna dobivaju se prosječne koncentracije ispitivane kemikalije i, po odabiru, DOC-a u stabilnom stanju u izlaznoj vodi. Osim što se određuje postotak opadanja ispitivane kemikalije i, fakultativno, DOC-a, u grafičkom se obliku izražava i odnos između uvjeta rada postrojenja i koncentracije u izlaznoj vodi. Iz tih provizornih podataka mogu se izračunati kinetičke konstante, a mogu se predvidjeti i uvjeti u kojima se ispitivana kemikalija može obrađivati.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

7. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 12. i 13.

RAZINE PROLAZNOSTI

8. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 14. i 15.

REFERENTNA ISPITIVANA KEMIKALIJA

9. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 16.

MJERNA OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITIVANJA

10. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 17. i 18.

OPIS METODE

Aparatura

11. Prikladna jedinica je modificirani sustav s propusnom posudom (Dodatak 6.1.). Sastoji se od unutarnje posude (ili punjenja) sačinjene od propusnog polietilena debljine 3,2 mm i veličine pora od približno 90 μm, s tupo zavarenim zglobom. (Zbog toga je ova jedinica čvršća od one opisane u stavku 21. ovog poglavlja, C.10 A). Punjenje se umetne u vanjsku posudu od nepropusnog polietilena, koja se sastoji od dvaju dijelova: kružnog dna u kojem se probuše provrti za dva zračna voda i jedan vod za izdvajanje mulja i gornjeg cilindra koji se vijcima pričvrsti za dno i čiji je ispust postavljen tako da daje poznati volumen (3 l) u posudu s propusnom posudom. Jedan zračni vod opremljen je difuzor-kamenom, a drugi je vod sa slobodnim krajem postavljen pod pravim kutom u odnosu na kamen u posudi. Taj sustav stvara turbulenciju potrebnu da se osigura potpuno miješanje sadržaja u posudi, te daje koncentracije otopljenog kisika veće od 2 mg/l.

12. Odgovarajući broj jedinica održava se na kontroliranim temperaturama u rasponu od 5 do 20 °C (± 1 °C), bilo u vodenoj kupelji bilo u prostorijama s konstantnom temperaturom. Potrebne su i crpke za doziranje u dozračne posude otopine ispitivane kemikalije i istaloženh otpadnih voda traženom brzinom (0-1,0 ml/min i 0-25 ml/min) te treća crpka za odvod otpadnog mulja iz dozračnih posuda. Potrebna, vrlo niska brzina protoka otpadnog mulja postiže se primjenom crpke podešene na veću brzinu i radom s prekidima primjenom brojčanika, npr. rad od 10 sekundi u minuti, brzina crpljenja od 3 ml/min, čime se postiže brzina izdvajanja od 0,5 ml/min.

Aparatura za filtraciju ili centrifuga

13. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 23.

Analitička oprema

14. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 24.

Voda

▼M4

15. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 25. i 26.

Organski medij

16. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 27.

Sintetičke otpadne vode

17. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 28.

Komunalne otpadne vode

18. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 29.

Aktivni mulj

19. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavak 30.

Radne otopine ispitivane kemikalije

20. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 31. i 32.

POSTUPAK

Priprema inokuluma

21. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, samo stavak 34. - koristite aktivni mulj (oko 2,5 g/l).

Broj ispitnih jedinica

22. Za jednostavan test, tj. za mjerenje postotka opadanja, potreban je samo jedan SRT, ali za dobivanje podataka neophodnih za izračun provizornih kinetičkih konstanti potrebno je 4-5 vrijednosti SRT-a. Obično se biraju vrijednosti između dva i deset dana. Praktično je zgodno provoditi test istodobno na 4 ili 5 SRT-a i pri istoj temperaturi; u proširenim se studijama koriste iste vrijednosti SRT-a, ili možda različit raspon vrijednosti, pri drugim temperaturama unutar raspona od 5 do 20 °C. Za primarnu biorazgradnju (osnovna uporaba) obično je potrebna samo jedna jedinica za svaki skup uvjeta. Međutim, za potpunu biorazgradivost potrebna je i kontrolna jedinica za svaki skup uvjeta, u koju se dodaju otpadne vode, ali ne i ispitivana kemikalija. Ako se sumnja da je u otpadnim vodama prisutna ispitivana kemikalija, bit će potrebno primijeniti i kontrolnu jedinicu prilikom procjene primarne biorazgradnje te poduzeti sve neophodne korekcije u izračunima.

Doza organskog medija i ispitivane kemikalije

23. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 36. do 39., ali imajte na umu da se otopina ispitivane kemikalije dozira zasebno i da se koriste različite brzine izdvajanja mulja. Isto tako, često pratite i, po potrebi, prilagodite unutar ± 10 % brzine protoka ulazne vode, izlazne vode i izdvajanja mulja, npr. dvaput dnevno. Ako se u analitičkim metodama kada se koriste komunalne otpadne vode suočite s poteškoćama, provedite test sa sintetičkim otpadnim vodama, ali potrebno je osigurati da različiti mediji daju usporedive kinetičke podatke.

Rukovanje jedinicama s aktivnim muljem

24. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 40. do 43., ali SRT kontrolirajte samo ‚konstantnim' izdvajanjem mulja.

Uzorkovanje i analiza

25. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 44. do 50., osim što se treba odrediti koncentracija ispitivane kemikalije, a fakultativno se može odrediti i DOC; ne smije se upotrebljavati KPK.

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

26. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 52. do 54.

Izražavanje rezultata ispitivanja

27. Primjenjuje se poglavlje C.10 A, stavci 56. do 62.

Izračun kinetičkih konstanti

28. Realističnije je navesti srednju koncentraciju ispitivane kemikalije u stabilnom stanju u izlaznoj vodi i opisati na koji način ona varira s radnim uvjetima postrojenja nego navesti postotak primarne biorazradnje. To se može postići razmatranjem jednadžbe (6) u Dodatku 6.2., koja može dati vrijednosti za K_S, μ_m i θ_{SC}, kritično vrijeme zadržavanja mulja.

(Kao druga mogućnost, mogu se dobiti približne vrijednosti K_S i μm pomoću jednostavnog računalnog programa kojim bi teoretska krivulja izračunata iz jednadžbe 2 (Dodatak 6.2.) odgovarala dobivenim pokusnim vrijednostima. Premda nijedna otopina nije jedinstvena, može se dobiti razumna približna vrijednost K_S i μ_m.)

Varijabilnost rezultata

29. Opće je iskustvo da se za pojedine kemikalije dobivaju varijabilne vrijednosti kinetičkih parametara. Smatra se da uvjeti u kojima je mulj rastao, kao i uvjeti koji pretežu u korištenom testu (kao što je u stavku 5. i u drugim testovima), značajno utječu na rezultirajuće vrijednosti. O jednom aspektu te varijabilnosti raspravljali su Grady i sur. (4), koji su predložili da se nazivi ‚postojeći' i ‚intrinzičan' primijene na dva skupa ekstremnih uvjeta koji predstavljaju granice fiziološkog stanja koje neka kultura može postići u kinetičkom pokusu. Ako nije dopušteno da se tijekom testa promijeni to stanje, vrijednosti kinetičkih parametara odražavaju uvjete u okolini iz koje su uzeti mikroorganizmi; te se vrijednosti nazivaju ‚postojeće'. Na drugom ekstremnom kraju, ako su uvjeti u testu takvi da dopuštaju potpuno razvijanje sustava sinteze bjelančevina, što omogućuje maksimalnu moguću brzinu rasta, za dobivene kinetičke parametre kaže se da su ‚intrinzični' te da ovise samo o naravi supstrata i vrstama bakterija u toj kulturi. Rukovoditi se treba time da se postojeće vrijednosti dobivaju održavanjem niskim omjera koncentracije i supstrata prema kompetentnim mikroorganizmima (S_o/X_o), npr. 0,025, a intrinzične vrijednosti pojavljuju se kad je taj omjer visok, npr. najmanje 20. U oba bi slučaja S_o trebalo biti jednako ili veće od relevantne vrijednosti Ks, konstante poluzasićenosti.

30. O varijabilnost i ostalim aspektima kinetike biorazgradnje raspravljalo se na nedavnoj radionici SETAC-a (5). Iz takvih studija, o kojima postoje izvješća i o kojima su se provodili projekti, trebao bi proizići jasniji pogled na kinetiku u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda kako bi se omogućilo bolje tumačenje postojećih podataka, kao i da bi se predložili relevantniji planovi za buduće ispitne metode.

LITERATURA:

1. Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

2. Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

3. Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

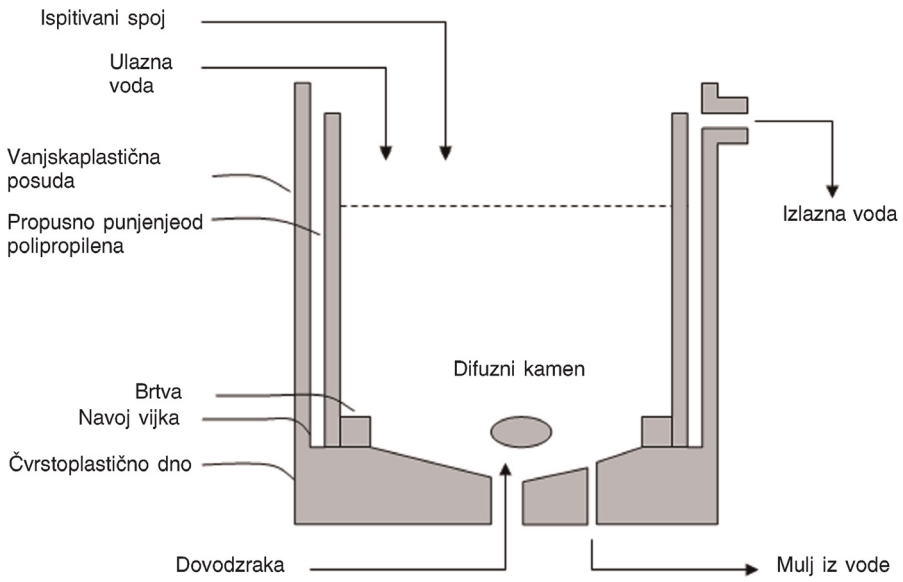
4. Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

5. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Dodatak 6.1.

Propusna posuda s kontrolom SRT-a



▼M4

Dodatak 6.2.

Izračun kinetičkih konstanti

1. Pod pretpostavkom da se primjenjuje Monodova kinetika te uzimajući u obzir bilancu mase aktivnih krutih tvari i supstrata u cijelom sustavu s aktivnim muljem (1), mogu se dobiti sljedeći izrazi:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ili

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

gdje je

S_1 = koncentracija supstrata u izlaznoj vodi, (mg/l)

K_S = konstanta poluzasićenosti, koncentracija na kojoj je $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifična brzina rasta (d^{-1})

μ_m = maksimalna vrijednost μ_m (d^{-1})

K_d = specifična brzina raspadanja aktivnih krutih tvari (d^{-1})

θ_S = srednje vrijeme zadržavanja mulja, SRT (d)

Ispitivanjem ove jednadžbe dolazi se do sljedećih zaključaka:

i. Koncentracija u izlaznoj vodi ne ovisi o koncentraciji u ulaznoj vodi (S_0); dakle, postotak biorazgradnje varira ovisno o koncentraciji u ulaznoj vodi, S_0.

ii. Jedini kontrolni parametar u postrojenju koji ima utjecaja na S_1 jest vrijeme zadržavanja mulja, θ_S.

iii. Za danu koncentraciju u ulaznoj vodi, S_0, postojat će kritično vrijeme zadržavanja mulja, takvo da je:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

gdje je

θ_{SC} = kritično vrijeme zadržavanja mulja, ispod kojega će se kompetentni mikroorganizmi isprati iz postrojenja.

iv. Budući da su ostali parametri u jednadžbi (2) povezani s kinetikom rasta, temperatura će vjerojatno imati utjecaja na razinu supstrata u izlaznoj vodi i na kritičnu starost mulja, tj. vrijeme zadržavanja mulja potrebno za dobivanje određenog stupnja pročišćavanja rast će s padom temperature.

2. Iz bilance mase krutih tvari u sustavu s propusnom posudom, a i pod pretpostavkom da je koncentracija krutih tvari u izlaznoj vodi u postrojenju, X_2, niska u usporedbi s koncentracijom u dozračnoj posudi, X_1, vrijeme zadržavanja mulja

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

i

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

gdje je

V = volumen dozračne posude (l)

X_1 = koncentracija krutih tvari u dozračnoj posudi (mg/l)

X_2 = koncentracija krutih tvari u izlaznoj vodi (mg/l)

Q_0 = brzina protoka ulazne vode (l/d)

Q_1 = brzina protoka otpadnog mulja (l/d)

Dakle, moguće je kontrolirati vrijeme zadržavanja mulja na bilo kojoj prethodno odabranoj vrijednosti kontroliranjem brzine protoka otpadnog mulja, Q_1.

Zaključci

3. Glavni cilj ovog testa je, dakle, omogućiti prognozu koncentracije u izlaznoj vodi, a time i razina ispitivane kemikalije u ulaznoj vodi.

4. Grafičkim prikazom S_1 u ovisnosti o θ_S, kritično vrijeme zadržavanja mulja, θ_{SC}, ponekad se može smjesta procijeniti, npr. krivulja 3 na slici 1. Kad to nije moguće, θ_{SC} se može izračunati, zajedno s približnim vrijednostima μ_m i K_S, grafičkim prikazom S_1 u ovisnosti o $S_1 \bullet \theta_S$.

Prebacivanjem veličina u jednadžbi (1) dobivamo

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ako je K_d malen, tada $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ i [5] postaje:

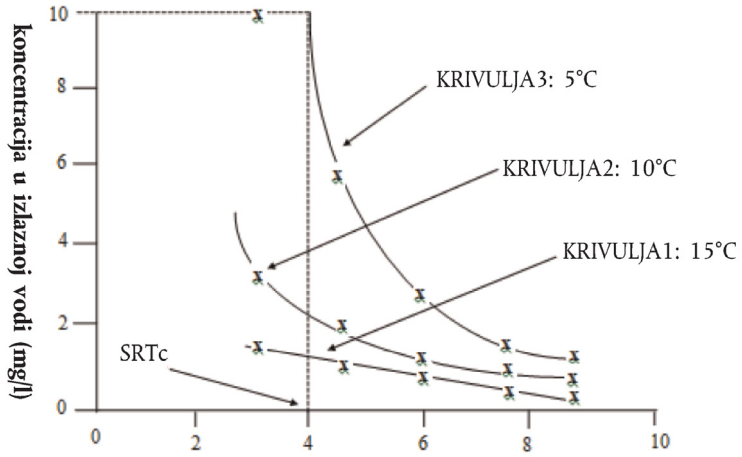
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Dakle, na grafičkom prikazu dobit ćemo ravnu crtu (vidjeti sliku 2.) nagiba $1/\mu_m$ a sjecište K_S/μ_m; a i $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

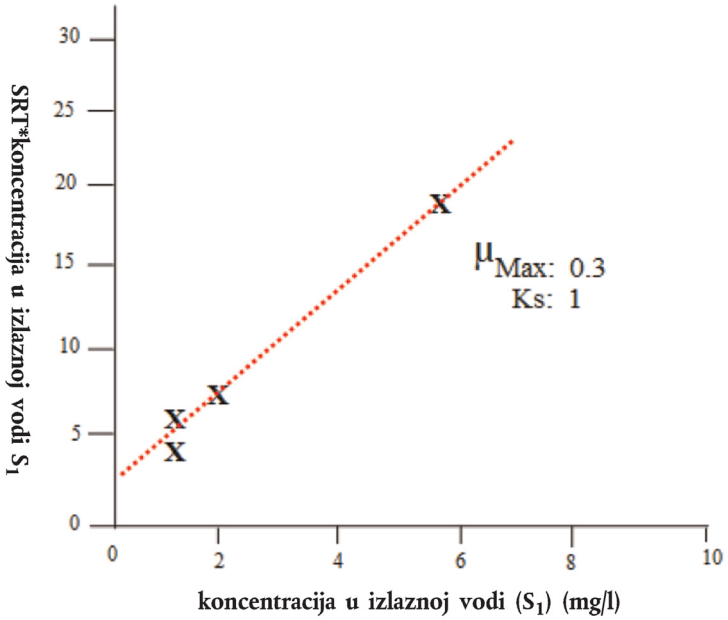
Slika 1.

Tri temperature; pet SRT-a



Slika 2.

Regresijska linija SRT · S_1 naspram S_1 na T = 5o C



Pojmovnik:

koncentracija u izlaznoj vodi

Krivulja

▼M4

Dodatak 7.

TEST U RASPONU NISKIH (μg/l) KONCENTRACIJA

1. Mnoge su kemikalije obično prisutne u vodenom okolišu, čak i u otpadnim vodama, u vrlo niskim koncentracijama (μg/l). U takvim koncentracijama one vjerojatno ne služe kao primarni supstrati koji rezultiraju rastom, nego je vjerojatnije da će se razgraditi kao sekundarni supstrati koji ne rastu, zajedno s nizom kemikalija koje sadržavaju ugljik, a koje se javljaju u prirodi. Stoga, ni razgradnja takvih kemikalija neće se uklapati u model opisan u Dodatku 6. Mogu se primijeniti brojni drugi modeli, a u uvjetima koji prevladavaju u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda moglo bi se istodobno primijeniti više od jednog modela. Za rasvjetljavanje te problematike bit će potrebna brojna istraživanja.

2. U međuvremenu, može se slijediti postupak iz glavnog dijela teksta (poglavlje C.10 A), ali samo za primarnu biorazgradivost, gdje se koriste prikladno niske koncentracije (< 100 μg/l) i potvrđeni analitički postupak. Može se izračunati postotak biorazgradnje (vidjeti stavak 54. Ispitne metode) pod uvjetom da se u obzir uzmu abiotički procesi (adsorpcija, hlapljivost itd.). Kao primjer može poslužiti studija autora Nyholma i njegovih suradnika (1)(2) u kojoj se koristi ciklus od 4 h u sustavu punjenja i pražnjenja. Oni su izvijestili o pseudo konstantama prvog reda za 5 kemikalija koje su se dodale sintetičkim otpadnim vodama u koncentraciji od 5 do 100 μg/l. (Za potpunu biorazgradivost mogu se koristiti ^{14}C obilježene ispitivane kemikalije. Opisivanje tog ciklusa seže onkraj područja primjene ove Ispitne metode jer dosad ne postoje dogovoreni postupci iako predložena metoda za ISO 14592 (3) sadržava smjernice o uporabi ^{14}C obilježenih kemikalija.

Test SCAS

3. Kasnije je predložen dvofazni test (4)(5)(6); iza metode aktivnog mulja s polukontinuiranim režimom (SCAS) slijedi kratkotrajni kinetički test na uzorcima uzetima iz jedinica SCAS. Sustav SCAS radi s poznatim brzinama izdvajanja mulja (za razliku od izvorne ispitne metode iz C.12), a u njega se ulijevaju izmijenjene sintetičke otpadne vode OECD-a ili komunalne otpadne vode. Sintetičke otpadne vode izmijenjene su (zbog promjene pH vrijednosti i slabog sposobnosti taloženja mulja) dodavanjem fosfata kao pufera, ekstrakta kvasca, željezova (III) klorida i soli elemenata u tragovima, a njihov KPK povišen je na oko 750 mg/l povećanjem koncentracije peptona i mesnog ekstrakta. Jedinice su pogonjene u ciklusu od 24 h: dozračivanje je trajalo 23 h, izdvajanje mulja, taloženje, izvlačenje supernatanta (iz izlazne vode) te su se nakon toga dodale sintetičke otpadne vode plus ispitivana kemikalija, do 100 μg/l, (tj. u otprilike istoj koncentraciji kao i u kratkotrajnom testu). Jedanput tjedno 10 % ukupnog mulja zamijenilo se svježim muljem kako bi se održala uravnotežena mikrobna populacija.

4. Mjerile su se koncentracije ispitivane kemikalije na početku i na kraju dozračivanja, a test se nastavio sve dok se nije postiglo konstantno opadanje ispitivane kemikalije; to traje od jednog tjedna do nekoliko mjeseci.

Kratkotrajni test

5. Primjenjuje se kratkotrajni test (npr. 8 sati) kako bi se odredila (pseudo) konstanta kinetičke brzine prvog reda iz raspadanja ispitivane kemikalije u aktivnom mulju poznatog, ali različitog podrijetla i povijesti. Posebice treba napomenuti da su uzorci mulja uzimani iz reaktora SCAS-a - na kraju razdoblja dozračivanja kad je niska koncentracija organskog supstrata - tijekom pokusa aklimatizacije (stavci 3., 4.). Mulj se može uzimati i iz paralelne jedinice SCAS koja nije izložena dodavanju ispitivane kemikalije,

▼M4

za potrebe usporedbe. Dozračuju se smjese mulja i ispitivane kemikalije koja se dodaje u dvjema ili većem broju koncentracija u rasponu od 1-50 μg/l, bez dodavanja sintetičkih otpadnih voda ili drugog organskog supstrata. Ispitivana kemikalija preostala u otopini određuje se u redovitim razmacima, npr. svakog sata, ovisno o razgradivosti kemikalije, tijekom razdoblja ne duljeg od 24h. Prije prikladne analize uzorci se centrifugiraju.

Izračuni

6. Podaci iz jedinica SCAS koriste se za izračun postotka opadanja ispitivane kemikalije (stavak 54.). Isto tako, i konstanta prosječne brzine, K_1, (normalizirana za koncentraciju suspendiranih krutih tvari) može se izračunati iz:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

gdje je

t = vrijeme dozračivanja (23h)

C_e = koncentracija na kraju razdoblja dozračivanja (μg/l)

C_i = koncentracija na početku razdoblja dozračivanja (μg/l)

SS = koncentracija krutih tvari u aktivnom mulju (g/l)

7. U kratkotrajnom testu grafički se prikazuje logaritamski % preostale koncentracije u ovisnosti o vremenu, a nagib početnog dijela (10-50 % razgradnje) grafičkog prikaza jednak je K_1, (pseudo) konstanti prvog reda. Ta se konstanta normalizira u pogledu koncentracije krutih tvari u mulju dijeljenjem nagiba s koncentracijom krutih tvari u mulju. Podaci iz izvješća moraju obuhvaćati i pojedinosti o početnim koncentracijama ispitivane kemikalije i suspendiranih krutih tvari, vrijeme zadržavanja mulja, punjenje i izvor mulja te pojedinosti o prethodnoj izloženosti (ako ona uopće postoji) ispitivanoj kemikaliji.

Varijabilnost rezultata

8. O varijabilnost i ostalim aspektima kinetike biorazgradnje raspravljalo se na nedavnoj radionici SETAC-a (7). Iz takvih studija, o kojima postoje izvješća i o kojima su se provodili projekti, trebao bi proizići jasniji pogled na kinetiku u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda kako bi se omogućilo bolje tumačenje postojećih podataka, kao i da bi se predložili relevantniji planovi za buduće ispitne metode.

LITERATURA

1. Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

2. Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

3. ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

4. Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

5. Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

6. Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilmovi

UVOD

1. Simulacijski testovi obično se provode s kemikalijama koje nisu prošle test pretraživanja na laku biorazgradivost (poglavlje C.4 A do F ovog Priloga (9)), ali su prošle test na biorazgradivost koja im je svojstvena. Iznimno se simulacijski testovi provode i sa svim kemikalijama o kojima se traži više informacija, posebice kemikalija u velikim količinama, a obično se primjenjuje test aktivnim muljem (C.10 A). Međutim, u nekim okolnostima traže se specifični podaci o ponašanju kemikalija prema metodama pročišćavanja otpadnih voda koje obuhvaćaju biofilmove, a posebno perkolacijske ili kapajuće filtre, rotirajuće biološke kontaktore, fluidizirane slojeve. Za zadovoljavanje te potrebe razvijeni su brojni uređaji.

2. Gerike *et al.* (1) koristili su velike, kapajuće pilot filtre, i to u povezanom načinu rada. Ti su filtri zauzimali mnogo prostora i za njih su bili potrebni relativno veliki volumeni otpadnih voda ili sintetičkih otpadnih voda. Truesdale *et al.* (2) opisali su manje filtre (promjera 6 ft × 6 in) kroz koje su puštane prirodne otpadne vode bez surfaktanta, ali su im i dalje trebali veliki volumeni. Čak je 14 tjedana bilo potrebno za razvijanje „zrelih" biofilmova, a još 4-8 tjedana nakon što je uveden ispitivani surfaktant po prvi puta da bi se počela odvijati aklimatizacija.

3. Baumann *et al.* (3) razvili su znatno manje filtre koji su koristili „flis" od poliestera koji je prije toga bio umočen u aktivni mulj kao inertni medij koji podržava biofilm. Ispitivana kemikalija koristila se kao jedini izvor ugljika, a biorazgradivost se procjenjivala iz mjerenja otopljenog organskog ugljika (DOC) u ulaznoj vodi i u izlaznoj vodi, a iz količine CO_2 procjenjivao se izlazni plin.

4. Posve drukčiji pristup zauzeli su Gloyna *et al.* (4) koji su izumili rotirajući cijevni reaktor. Na unutarnjoj površini rotirajuće cijevi uzgajan je biofilm na poznatoj površini prolaskom ulazne vode koja se dodavala na gornjem vrhu cijevi, nagnute pod malim kutom u odnosu na horizntalu. Reaktor se koristio za proučavanje biorazgradivosti surfaktanata (5), kao i za ispitivanje optimalne debljine biofilma i raspršenja kroz taj film (6). Nadalje, potonji su autori razvili reaktor, ali su ga i izmijenili kako bi mogli odrediti CO_2 u izlaznom plinu.

5. Stalni odbor analitičara (*Standing Committee of Analysts* (UK)) usvojio je rotirajući cijevni reaktor kao standardnu metodu za procjenu kako biorazgradivosti kemikalija (7) tako i pročistivosti i toksičnosti otpadih voda (8). Prednosti ovdje opisane metode jesu jednostavnost, kompaktnost, mjerna obnovljivost i potreba za relativno malim volumenima organskog medija.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Sintetičke ili komunalne otpadne vode, i ispitivana kemikalija, u smjesama ili samostalno, nanose se na unutarnju površinu nagnute cijevi koja se sporo okreće. Na toj se unutarnjoj površini stvara sloj mikroorganizama, sličan sloju na biofiltru. Odabiru se uvjeti rada reaktora kako bi se postigla adekvatna eliminacija organske tvari i, po potrebi, oksidacija amonijaka.

▼M4

7. Skupi se izlazna voda iz cijevi i ona se ili taloži i/ili filtrira prije analize na otopljeni organski ugljik (DOC) i/ili na ispitivanu kemikaliju specifičnom metodom. Kontrolne jedinice u koje se ne dodaje ispitivana kemikalija pogone se paralelno u istim uvjetima u poredbene svrhe. Pretpostavlja se da je razlika između koncentracije DOC-a u izlaznoj vodi u ispitnoj i kontrolnoj jedinici rezultat ispitivane kemikalije i njezinih organskih metabolita. Ta se razlika uspoređuje s koncentracijom dodane ispitivane kemikalije (kao DOC-a) kako bi se izračunala eliminacija ispitivane kemikalije.

8. Biorazgradnja se obično može razlikovati od bioadsorpcije pomnim proučavanjem krivulje eliminacije. Potvrda se obično može dobiti primjenom testa na laku biorazgradnju (apsorpcija kisika ili proizvodnja ugljikova dioksida) pomoću aklimatiziranog inokuluma koji se uzima na kraju testa iz reaktora u koje se dodala ispitivana kemikalija.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

9. Trebali bi biti poznati čistoća, topljivost u vodi, hlapljivost i adsorpcijska svojstva ispitivane kemikalije kako bi se omogućilo ispravno tumačenje nastalih rezultata.

10. Obično se hlapljive i slabo topljive kemikalije ne mogu ispitivati ako se ne poduzmu posebne mjere opreza (vidjeti Dodatak 5. poglavlju C.10 A). Također bi trebala biti poznata i kemijska struktura ili barem empirijska formula kako bi se izračunale teoretske vrijednosti i/ili provjerile izmjerene vrijednosti parametara, npr. teoretska potrošnja kisika (TPK), DOC.

11. Informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije po mikroorganizme (vidjeti Dodatak 4. poglavlju C.10 A) mogu biti korisne za odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija te mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje.

RAZINE PROLAZNOSTI

12. Izvorno je bilo potrebno da primarna biorazgradnja surfaktanata dosegne 80 % ili više prije nego što bi se kemikalija mogla staviti na tržište. Ako se ne postigne vrijednost od 80 %, može se primijeniti simulacijski (potvrdni) test, a surfaktant se smije staviti na tržište tek ako specifična kemikalija opadne za više od 90 %. Kod kemikalija općenito nije upitna razina (ne)prolaznosti, a vrijednost postotka opadanja može se upotrijebiti u približnim izračunima vjerojatne koncentracije u okolišu koja će se koristiti u procjeni opasnosti koju predstavljaju te kemikalije. U nizu studija o čistim kemikalijama došlo je do rezultata da je postotak opadanja DOC-a > 90 % u više od tri četvrtine te > 80 % u više od 90 % kemikalija koje su pokazale značajniji stupanj biorazgradivosti.

REFERENTNE KEMIKALIJE

13. Kako bi se osiguralo ispravno provođenje pokusnog postupka, korisno je povremeno ispitati referentne kemikalije za koje je poznato kako se ponašaju. Takve kemikalije obuhvaćaju adipinsku kiselinu, 2fenil fenol, 1-naftol, difensku kiselinu i 1-naftolnu kiselinu.

MJERNA OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITIVANJA

14. Laboratorij u Ujedinjenoj Kraljevini utvrdio je da relativno standardno odstupanje u testovima iznosi 3,5 %, a među testovima 5 % (7).

▼M4

OPIS METODE

Aparatura

Rotirajući cijevni reaktori

15. Aparatura (vidjeti slike 1. i 2. u Dodatku 8.) sastoji se od svežnja akrilnih cijevi duljine 30,5 cm i unutarnjeg promjera 5 cm, koje stoje na kotačima s gumenim obručem u metalnom potpornom okviru. Svaka cijev ima vanjsku brtvu, dubine približno 0,5 cm, da bi se zadržala na kotačima, unutarnja površina sastruže se grubom žičanom vunom, a na gornjem vrhu (ulijevu) nalazi se unutarnja brtva dubine 0,5 cm koja zadržava tekućinu. Cijevi su nagnute pod kutom od otprilike jednog stupnja u odnosu na horizontalu kako bi se postiglo potrebno vrijeme kontakta kada se medij ulije u čistu cijev. Kotače s gumama okreće spori motor varijabilne brzine. Temperaturu u cijevima kontrolira instalacija u prostoriji s konstantnom temperaturom.

16. Stavljanjem svakog cijevnog reaktora unutar malo veće, začepljene cijevi i osiguravanjem da su spojevi plinonepropusni, izlazni plin CO_2 može se skupljati u alkalnu otopinu za naknadno mjerenje (6).

17. 24-satno punjenje, za svaku cijev, organskog medija u koji je, po potrebi, dodana ispitivana kemikalija nalazi se u spremniku od 20 l (A)(vidjeti sliku 2.). Ako je to potrebno, otopina ispitivane kemikalije može se zasebno dozirati. Blizu dna svakog spremnika postoji ispust spojen odgovarajućim cjevovodom, npr. silikonskom gumom, putem peristaltičke crpke (B) sa staklenom ili akrilnom dovodnom cijevi koja 24 cm ulazi u gornji kraj (ulijev) nagnute cijevi (C). S donjeg kraja nagnute cijevi omogućeno je kapanje izlazne vode koja se skuplja u drugi spremnik (D). Prije analize izlazna se voda taloži ili filtrira.

Aparatura za filtriranje-centrifugiranje

18. Uređaj za filtraciju uzoraka pomoću membranskih filtara prikladne propusnosti (nazivni promjer otvora 0,45 μm) koji adsorbira organske kemikalije ili ispušta organski ugljik u minimalnoj količini. Ako se koriste filtri koji ispuštaju organski ugljik, pažljivo se operu vrućom vodom kako bi se uklonio organski ugljik koji curi. Druga je mogućnost primjena centrifuge koja može postići 40 000 m/s^2.

19. Analitička oprema za određivanje:

— DOC-a/ukupnog organskog ugljika (TOC-a), ili kemijske potrošnje kisika (KPK-a);

— specifične kemikalije (HPLC (visokodjelotvorna tekućinska kromatografija), GC (plinska kromatografija) itd.) ako je potrebno;

— pH-a, temperature, kiselosti, lužnatosti;

— amonijaka, nitrita i nitrata ako se testovi provode u uvjetima nitrifikacije.

Voda

20. Voda iz slavine koja sadržava manje od 3 mg/l DOC-a.

21. Destilirana ili deionizirana voda koja sadržava manje od 2 mg/l DOC-a.

▼M4

Organski medij

22. Kao organski medij mogu se koristiti sintetičke otpadne vode, komunalne otpadne vode ili njihova kombinacija. Pokazalo se da uporaba samo komunalnih otpadnih voda često dovodi do povećanog postotka opadanja DOC-a (u jedinicama s aktivnim muljem), pa čak i da omogućuje biorazgradnju nekih kemikalija koje se biološki ne razgrađuju kada se upotrebljavaju sintetičke otpadne vode OECD-a. Dakle, preporučuje se uporaba komunalnih otpadnih voda. Izmjerite koncentraciju DOC-a (ili KPK-a) u svakoj novoj šarži organskog medija. Trebale bi biti poznate kiselost ili lužnatost organskog medija. Moguće je da će zbog medija biti potrebno dodavanje odgovarajućeg pufera (natrijev hidrogenkarbonat ili kalijev dihidrogen fosfat) ako je niske kiselosti ili lužnatosti kako bi se pH tijekom testa održao na oko 7,5 ± 0,5 u reaktoru. O količini pufera te o trenutku dodavanja odlučuje se u svakom pojedinom slučaju.

Sintetičke otpadne vode

23. Po 1 litri vode iz slavine otopi se: pepton, 160 mg; mesni ekstrakt, 110 mg; urea, 30 mg; anhidridni dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO4), 28 mg; natrijev klorid (NaCl), 7 mg; kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. Te sintetičke otpadne vode OECD-a služe samo kao primjer i daju srednju koncentraciju DOC-a u ulaznoj vodi od oko 100 mg/l. Druga je mogućnost primjena drugih smjesa koje imaju otprilike iste koncentracije DOC-a, a koje su sličnije pravim otpadnim vodama. Te se sintetičke otpadne vode mogu napraviti u destiliranoj vodi u koncentriranom obliku i mogu se čuvati na oko 1 °C do tjedan dana. Po potrebi se razrijede vodom iz slavine. (Ovaj medij nije zadovoljavajući, npr. vrlo je visoka koncentracija dušika, relativno je nizak sadržaj ugljika, ali nije predloženo ništa bolje, osim da se doda više fosfata kao pufera i dodatnog peptona).

Komunalne otpadne vode

24. Koristite svježe istaložene otpadne vode koje se skupljaju svakodnevno iz postrojenja za pročišćavanje u koje se pretežno dodaju komunalne otpadne vode. Njih bi trebalo skupiti iz preljevnog kanala primarnog taložnika ili iz ulijeva postrojenja s aktivnim muljem te u njima uglavnom ne bi smjelo biti grubih čestica. Te se otpadne vode mogu koristiti nekoliko dana nakon skladištenja na oko 4 °C ako se dokaže da nije došlo do znatnijeg opadanja DOC-a (ili KPK-a) (npr. za manje od 20 %) tijekom skladištenja. Da bi se ograničile smetnje u sustavu, trebalo bi prije uporabe prilagoditi DOC (ili KPK) svake nove šarže na odgovarajuću konstantnu vrijednost, npr. razrjeđivanjem vodom iz slavine.

Sredstvo za podmazivanje

25. Za podmazivanje valjaka peristaltičke crpke mogu se upotrijebiti glicerol ili maslinovo ulje: oboje je prikladno za uporabu na cjevovodu od silikonske gume.

Radne otopine ispitivane kemikalije

26. Za kemikalije odgovarajuće topljivosti pripremite radne otopine prikladnih koncentracija (npr. 1 do 5 g/l) u deioniziranoj vodi ili u mineralnom dijelu sintetičkih otpadnih voda. Za netopljive kemikalije vidjeti Dodatak 5. u poglavlju C.10-A. Ta metoda nije prikladna za hlapljive kemikalije ako se ne izmijene cijevni reaktori (stavak 16.). Odredite DOC i TOC radne otopine pa ponovite mjerenja za svaku novu šaržu. Ako je razlika između DOC-a i TOC-a veća od 20 %, provjerite topljivost u vodi ispitivane kemikalije. Usporedite DOC ili koncentraciju ispitivane kemikalije izmjerene specifičnom analizom radne otopine s nazivnom vrijednošću kako biste

▼M4

utvrdili je li obnavljanje dovoljno dobro (obično se može očekivati > 90 %). Utvrdite, posebno za disperzije, može li se ili ne može DOC koristiti kao analitički parametar ili se može koristiti samo jedna analitička tehnika specifična za ispitivanu kemikaliju. Za disperziju je potrebna centrifuga uzoraka. Za svaku novu šaržu izmjerite DOC, KPK ili ispitivanu kemikaliju pomoću specifične analize.

27. Odredite pH radne otopine. Ekstremne vrijednosti znak su toga da dodavanje kemikalije možda utječe na pH aktivnog mulja u sustavu ispitivanja. U tom slučaju neutralizirajte radnu otopinu kako biste dobili pH od 7 ± 0,5 s malim količinama anorganske kiseline ili lužine, ali izbjegavajte precipitaciju (taloženje) ispitivane kemikalije.

POSTUPAK

Priprema organskog medija za doziranje

28. Pobrinite se da na početku i tijekom testa temeljito očistite spremnike ulazne i izlazne vode te cjevovode iz posude ulazne i posude izlazne vode kako biste uklonili nakupine mikroba.

29. Pripremite sintetičke otpadne vode (stavak 23.) nanovo svakog dana bilo od krutih tvari bilo od koncentrirane radne otopine što se razrijeđuju vodom iz slavine. Izmjerite potrebnu količinu u cilindru pa je dodajte u čistu posudu za ulaznu vodu. Isto tako, kad je to neophodno, u sintetičke otpadne vode prije razrjeđivanja dodajte potrebnu količinu radne otopine ili referentne kemikalije. Ako je zgodnije ili neophodno za izbjegavanje gubitka ispitivane kemikalije, pripremite zasebnu razrijeđenu otopinu ispitivane kemikalije u zasebnom spremniku pa je drugom dozirnom crpkom ulijte u nagnute cijevi.

30. Druga (i preferirana) mogućnost jest korištenje istaložene komunalne otpadne vode (stavak 24.) koje, ako je to moguće, se nanovo skupljaju svakoga dana.

Rad rotirajućih cijevnih reaktora

31. Za procjenu jedne ispitivane kemikalije potrebna su dva identična cijevna reaktora i oni se sastavljaju u prostoriji s konstantnom temperaturom, obično na 22 ± 2 °C.

32. Podesite peristaltičku crpku kako bi crpila 250 ± 25 ml/h organskog medija (bez ispitivane kemikalije) u nagnute cijevi, koje se rotiraju brzinom od 18 ± 2 opm. Nanesite sredstvo za podmazivanje (stavak 25.) na cijevi crpke, i to na početku testa i povremeno tijekom testa kako bi se osigurao njihov ispravan rad i produljio životni vijek cijevi.

33. Podesite kut nagnutosti cijevi u odnosu na horizontalu kako bi se dobilo vrijeme djelovanja od 125 ± 12,5 s za ulijevanje u čistu cijev. Procijenite vrijeme zadržavanja dodavanjem nebiološkog markera (npr. NaCl, inertno bojilo) u ulijev: smatra se da vrijeme potrebno za postizanje vršne koncentracije u izlaznoj vodi predstavlja srednje vrijeme zadržavanja (kad postoji maksimalni film, vrijeme zadržavanja može se povećati do 30 min.).

34. Pokazalo se da te stope, brzine i vremena rezultiraju adekvatnim opadanjem (> 80 %) DOC-a (ili KPK-a) te da stvaraju nitrificiranu izlaznu vodu. Stopu protoka treba izmijeniti ako opadanje nije dostatno ili ako treba simulirati radnu uspješnost točno određenog postrojenja za pročišćavanje. U potonjem slučaju podešavajte brzinu doziranja organskog medija sve dok radna uspješnost reaktora ne bude jednaka radnoj uspješnosti postrojenja za pročišćavanje.

▼M4

Inokulacija

35. Možda će inokulacija zrakom biti dovoljna za početak rasta mikroorganizama kada se koriste sintetičke otpadne vode, ali u protivnom dodajte 1 ml/l istaloženih otpadih voda u ulijev za 3 dana.

Mjerenja

36. U redovitim razmacima provjeravajte jesu li dozirane količine i brzine okretanja unutar traženih granica. Isto tako, izmjerite i pH izlazne vode, posebno ako se očekuje nitrifikacija.

Uzorkovanje i analiza

37. Metoda, obrazac i učestalost uzorkovanja biraju se tako da odgovaraju svrsi testa. Primjerice, uzmite brze uzorke ulazne i izlazne vode ili skupljajte uzorke tijekom duljeg razdoblja, npr. 36 h. U prvom razdoblju, bez ispitivane kemikalije, uzimajte uzorke dvaput tjedno. Profiltrirajte uzorke kroz membrane ili ih centrifugirajte na oko 40 000 m/s^2 otprilike 15 min (stavak 18.). Možda će biti potrebno pustiti uzorke da se istalože i/ili ih filtrirati kroz grubi filtar prije filtracije kroz membranu. Provedite određivanja DOC-a (ili KPK-a) najmanje dva puta te, ako je potrebno, i BPK-a, amonijaka i nitrita/nitrata.

38. Sve analize treba provesti što je moguće prije nakon skupljanja i pripreme uzoraka. Ako se analize moraju odgoditi, uskladištite uzorke na oko 4 °C na tamnom mjestu u do vrha napunjenim i čvrsto zatvorenim bocama. Ako se uzorci moraju skladištiti dulje od 48 h, konzervirajte ih dubokim smrzavanjem, acidifikacijom ili dodavanjem odgovarajuće toksične kemikalije (npr. 20 ml/l otopine merkurijeva (II) klorida od 10 g/l). Pobrinite se da tehnika konzerviranja ne utječe na rezultate analize.

Faza ustaljenja

39. U ovoj fazi površinski biofilm naraste do optimalne debljine, što obično traje oko dva tjedna, a ne bi trebalo premašiti šest tjedana. Opadanje (stavak 44.) DOC-a (ili KPK-a) se povećava i doseže vrijednost platoa. Kad se plato dosegne na sličnoj vrijednosti u obje cijevi, jedna se odabire da bude kontrolna u ostatku testa, tijekom kojega bi njihova radna uspješnost trebala ostati dosljedna.

Uvođenje ispitivane kemikalije

40. U ovoj fazi dodajte ispitivanu kemikaliju u drugi reaktor u traženoj koncentraciji, obično 1020 mg C/l. U kontrolnu se cijev i dalje dodaje samo organski medij.

Faza aklimatizacije

41. Nastavite s analizama DOC-a (ili KPK-a) dvaput tjedno te, ako treba procijeniti i primarnu biorazgradivost, izmjerite i koncentraciju ispitivane kemikalije specifičnom analizom. Ostavite jedan do šest tjedana (ili dulje u posebnim uvjetima) za aklimatizaciju nakon što je ispitivana kemikalija uvedena po prvi put. Kada postotak opadanja (stavci 43.-45.) dosegne maksimalnu vrijednost, dobivajte 1215 valjanih vrijednosti u fazi platoa tijekom otprilike tri tjedna radi procjene srednjeg postotka opadanja. Smatra se da je test završen kad se postigne dovoljno visok stupanj eliminacije. Neka trajanje testa ne bude duže od 12 tjedana nakon prvog dodavanja ispitivane kemikalije.

▼M4

Ljuštenje filma

42. Naglo vađenje većih količina viška filma iz cijevi, ili ljuštenje, odvija se u relativno redovitim razmacima. Kako bi se osiguralo da to nema utjecaja na poredbenost rezultata, dajte da testovi obuhvate najmanje dva puna ciklusa rasta i ljuštenja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

43. Izračunajte postotak eliminacije DOC-a (ili KPK-a) ispitivane kemikalije za svaku vremenski određenu procjenu pomoću sljedeće jednadžbe:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

gdje je

D_t = postotak eliminacije DOC-a (ili KPK-a) u vremenu t;

Cs = koncentracija DOC-a (ili KPK-a) u ulaznoj vodi nastala zbog ispitivane kemikalije, po mogućnosti procijenjene iz koncentracije, i volumena dodanog u radnu otopinu (mg/l);

E = izmjereni DOC (ili KPK) u ispitnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l);

Eo = izmjereni DOC (ili KPK) u kontrolnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l).

Ponovite izračun i za referentnu kemikaliju, ako se ista ispituje.

Radna uspješnost kontrolnog reaktora

44. Stupanj eliminacije DOC-a (ili KPK-a) (D_B) organskog medija u kontrolnom reaktoru korisna je informacija pri procjeni aktivnosti biorazgradnje biofilma tijekom testa. Postotak eliminacije izračunajte pomoću jednadžbe:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

gdje je

Cm = DOC (ili KPK) organskog medija u kontrolnoj ulaznoj vodi (mg/l).

45. Izračunajte opadanje (D_{ST}) ispitivane kemikalije, ako se ono mjerilo, specifičnom analitičkom metodom u svakom vremenski određenom određivanju iz jednadžbe:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\%$$

gdje je

Si = izmjerena ili, po mogućnosti, procijenjena koncentracija ispitivane kemikalije u ispitnoj ulaznoj vodi (mg/l)

Se = izmjerena koncentracija ispitivane kemikalije u ispitnoj izlaznoj vodi u vremenu t (mg/l)

▼M4

Ako analitička metoda rezultira pozitivnom vrijednošću u neizmijenjenim otpadnim vodama koja je jednaka S_c mg/l, izračunajte postotak opadanja (D_{SC}) iz:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Izražavanje rezultata ispitivanja

46. Grafički prikažite postotak eliminacije D_t i D_{ST} (ili D_{SC}), ako je raspoloživ, u ovisnosti o vremenu (vidjeti Dodatak 2. u poglavlju C.10- A). Uzmite srednju vrijednost (zaokruženu na najbliži cijeli broj) i standardno odstupanje 12-15 vrijednosti za D_T (i za D_{ST}, ako je raspoloživ) dobivene u fazi platoa kao postotak opadanja ispitivane kemikalije. Iz oblika krivulje eliminacije mogu se izvući izvjesni zaključci o procesima opadanja.

Adsorpcija

47. Ako se na početku testa zamijeti velika eliminacija DOC-a ispitivane kemikalije, ispitivana kemikalija vjerojatno se eliminira adsorpcijom na biofilm. To je moguće dokazati određivanjem adsorbirane ispitivane kemikalije na krutim tvarima oljuštenima iz filma. Nije uobičajeno da eliminacija DOC-a kemikalija koje se mogu adsorbirati ostane visoka tijekom cijelog testa; obično je u početku visok stupanj opadanja koji postupno pada do neke uravnotežene vrijednosti. Međutim, ako je adsorbirana ispitivana kemikalija mogla izazvati aklimatizaciju mikrobne populacije, eliminacija DOC-a ispitivane kemikalije naknadno bi porasla i postigla visoku vrijednost platoa.

Faza prilagodbe („lag” faza)

48. Kao i u statičkim testovima probira, za brojne je ispitivane kemikalije potrebna faza prilagodbe („lag” faza) prije nego što dođe do potpune biorazgradnje. U fazi prilagodbe odvija se aklimatizacija (ili prilagodba) kompetentnih bakterija, pri čemu ispitivana kemikalija gotovo uopće ne opada, a potom dolazi do početnog rasta tih bakterija. Ta faza završava, a proizvoljno se smatra da faza razgradnje započinje nakon što opadne otprilike 10 % početne količine ispitivane kemikalije (nakon što se odvoji dovoljno vremena za adsorpciju, ako se ona događa). Faza prilagodbe često je krajnje varijabilna i slabo se može mjerno obnoviti.

Stacionarna faza (faza platoa)

49. Stacionarna faza (faza platoa) krivulje eliminacije u neprekidnom testu definira se kao faza u kojoj dolazi do maksimalne razgradnje. Ta faza trebala bi trajati najmanje tri tjedna i imati oko 1215 izmjerenih valjanih vrijednosti.

Srednji stupanj eliminacije ispitivane kemikalije

50. Izračunajte srednju vrijednost iz vrijednosti eliminacije D_t (i D_{st}, ako je raspoloživ) ispitivane kemikalije u stacionarnoj fazi. Zaokružite na najbliži cijeli broj (1 %) i dobit ćete stupanj eliminacije ispitivane kemikalije. Također se preporučuje da se izračuna i 95 % intervala pouzdanosti srednje vrijednosti. Na sličan način izračunajte i srednji stupanj (D_B) eliminacije organskog medija u kontrolnoj posudi.

▼M4

Navođenje biorazgradnje

51. Ako se ispitivana kemikalija ne adsorbira značajno na biofilm i ako krivulja eliminacije ima tipičan oblik krivulje biorazgradnje s fazama prilagodbe, razgradnje i stacionarnom fazom (stavci 48., 49.), izmjerena eliminacija može se sa sigurnošću pripisati biorazgradnji. Ako dođe do velikog početnog opadanja, simulacijskim testom ne mogu se razlikovati procesi biološke i abiotičke eliminacije. U takvom slučaju, ali i u svim drugim slučajevima u kojima postoji bilo kakva dvojba o biorazgradnji (npr. ako dođe do ljuštenja), analizirajte adsorbiranu ispitivanu kemikaliju na uzorcima filma ili provedite dodatne statične testove (testove pretraživanja na) biorazgradnju na temelju parametara koji jasno označuju biološke procese. Takvi su testovi metode apsorpcije kisika (poglavlje C.4 ovog Priloga D, E i F) (9) ili test kojim se mjeri proizvodnja CO_2 (poglavlje C.4-C ovog Priloga ili metoda Headspace) (10); kao inokulum upotrijebite prethodno izloženi biofilm iz odgovarajućeg reaktora.

52. Ako se izmjere i opadanje DOC-a i opadanje specifične kemikalije, znatne razlike (prethodna vrijednost niža od potonje) među postocima opadanja naznačuju prisutnost u izlaznoj vodi intermedijarnih organskih proizvoda koji se možda teže razgrađuju; njih bi trebalo ispitati.

Valjanost rezultata ispitivanja

53. Test možete smatrati valjanim ako je stupanj eliminacije DOC-a (ili KPK-a) u kontrolnim jedinicama > 80 % nakon 2 tjedna rada i ako niste primijetili ništa neobično.

54. Ako je ispitivana (referentna) kemikalija koja se lako biorazgrađuje, stupanj biorazgradnje treba biti > 90 %, a razlika među vrijednostima dvostrukog određivanja ne smije biti veća od 5 %. Ako nisu ispunjena ta dva uvjeta, revidirajte pokusni postupak i/ili dobijte komunalne otpadne vode iz nekog drugog izvora.

55. Slično tomu, vrijednosti biorazgradnje iz dvostrukih jedinica (ako se koriste) u kojima se pročišćava ispitivana kemikalija ne bi se smjele razlikovati za više od 5 %. Ako nije ispunjen taj kriterij, ali je opadanje veliko, nastavite provoditi analizu još tri tjedna. Ako je opadanje nisko, istražite inhibitorni učinak ispitivane kemikalije, ako on već nije poznat, pa ponovite test na nižoj koncentraciji ispitivane kemikalije, ako je to izvedivo.

Izvješće o ispitivanju

56. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće:

Ispitivana kemikalija:

— podaci za identifikaciju;

— fizikalno stanje i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva.

Uvjeti ispitivanja:

— sve izmjene sustava ispitivanja, posebno ako se ispituju netopljive ili hlapljive tvari;

— vrsta organskog medija;

— udio i narav industrijskih otpadnih voda u otpadnim vodama, ako se koriste i ako je poznato;

— metoda inokulacije;

▼M4

— sadržaj DOC-a (otopljenog organskog ugljika) i TOC-a (ukupnog organskog ugljika) radne otopine ispitivane kemikalije; način njezine pripreme, ako je riječ o suspenziji; korištena ispitna koncentracija/koncentracije, obrazloženje ako je vanjski raspon DOC-a 1020 mg/l; metoda dodavanja; datum prvog dodavanja; sve promjene koncentracije;

— srednje vrijeme hidrauličkog zadržavanja (bez rasta); brzina okretanja cijevi; približni kut nagnutosti, ako je moguće;

— pojedinosti o ljuštenju; vrijeme i intenzitet;

— ispitna temperatura i raspon;

— primijenjene analitičke tehnike.

Rezultati ispitivanja:

— svi izmjereni podaci DOC, KPK, specifične analize, pH, temperatura, N kemikalije, ako je relevantno,

— svi izračunati podaci D_t (ili D_{tc}), D_B, D_s dobivene u tabličnom obliku i krivuljama eliminacije,

— podaci o fazi prilagodbe („lag" fazi) i stacionarnoj fazi (fazi platoa), trajanju testa, stupnju eliminacije ispitivane kemikalije, referentne kemikalije (ako je ispitivana) i organskog medija (u kontrolnoj jedinici), zajedno sa statističkim podacima i izjavama o biorazgradivosti i valjanosti testa,

— rasprava o rezultatima.

LITERATURA

1. Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

2. Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

3. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

4. Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

5. Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

6. Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

7. Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8. Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9. Poglavlje C.4 ovog Priloga, Određivanje „lake" biorazgradivosti A-F.

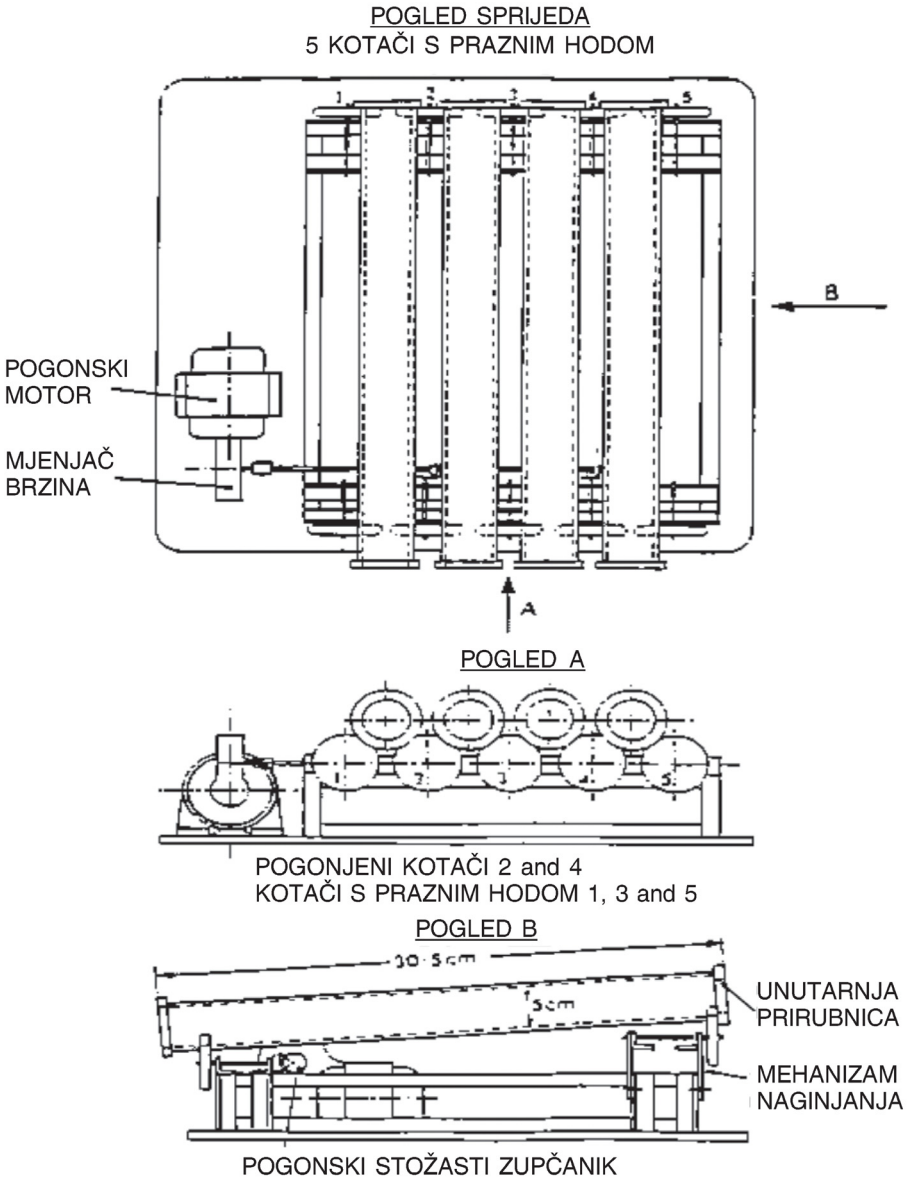
10. ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Dodatak 8.

Slika 1.

Rotirajuće cijevi



Pojmovnik:

Pogled sprijeda

Pogled A

Pogled B

Pogonjeni kotači

Kotači s praznim hodom

Pogonski motor

Mjenjač brzina

Unutarnja prirubnica

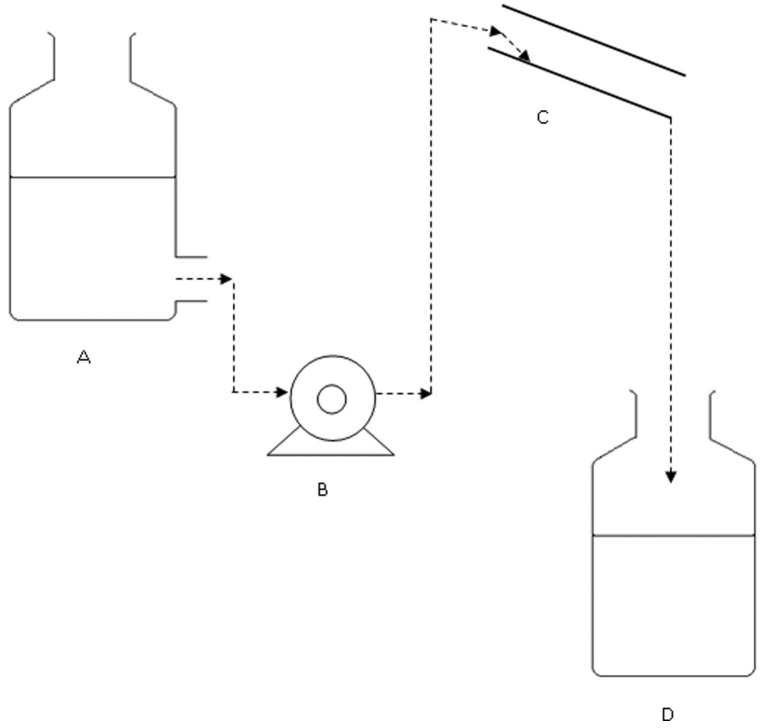
Mehanizam naginjanja

Pogonski stožasti zupčanik

▼**M4**

Slika 2.

Dijagram toka



A: Spremnik za ulijevanje

B: Peristaltička crpka

C: Rotirajuća cijev

D: Posuda za skupljanje izlazne vode

DEFINICIJE:

a. Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom Ispitnom metodom.

b. Kemikalije: „Treba napomenuti da se pojam ‚kemikalija' koristi u širokom smislu riječi u smislu sporazuma UNCED-a (Konferencije Ujedinjenih naroda o okolišu i razvoju) i naknadnih dokumenata te obuhvaća tvari, proizvode, smjese, pripravke ili sve druge pojmove koji se možda koriste u postojećim sustavima za označavanje područja valjanosti".

▼M6

C.11. AKTIVNI MULJ, TEST INHIBICIJE DISANJA (OKSIDACIJA UGLJIKA I AMONIJAKA)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 209 (2010.). Ovom se ispitnom metodom opisuje način određivanja učinaka kemikalije na mikroorganizme iz aktivnog mulja (uglavnom bakterije) mjerenjem njihove stope disanja (oksidacije ugljika i/ili amonijaka) u definiranim uvjetima u prisutnosti različitih koncentracija ispitivane kemikalije. Ova se ispitna metoda temelji na testu ETAD-a (engl. *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry* – Ekološko i toksikološko udruženje industrijskih proizvođača bojila) (1) (2), na prethodnoj smjernici TG 209 OECD-a (3) postojećem poglavlju C.11 ovog Priloga (3) i na revidiranoj normi ISO 8192 (4). Svrha je ispitivanja osigurati brzu orijentacijsku metodu za procjenu učinaka kemikalija na mikroorganizme iz aktivnog mulja tijekom biološke (aerobne) faze obrade otpadnih voda u postrojenjima za pročišćavanje. Rezultati ispitivanja mogu poslužiti i kao pokazatelj prikladnih neinhibitornih koncentracija ispitivanih kemikalija koje će se upotrebljavati u ispitivanjima biorazgradivosti (na primjer, poglavlja C.4 A – F, C.9, C.10, C12 i C.29 ovog Priloga, OECD TG302C). U tom se slučaju ispitivanje može provesti kao test probira, slično kao test za određivanje raspona ili granični test (vidjeti stavak 39.), uzimajući u obzir samo sveukupno disanje. Međutim, te podatke treba pažljivo uzimati u obzir za testove lake biorazgradivosti (poglavlja C.4 A – F i C.29 ovog Priloga) za koje je koncentracija inokuluma znatno niža od one koja se upotrebljava u ovoj ispitnoj metodi. Zapravo, odsutnost inhibicije u ovom testu disanja ne znači automatski postojanje neinhibitornih uvjeta u testu lake biorazgradivosti iz poglavlja C.4 A – F ili C.29 ovog Priloga.

2. Iako se općenito čini da se test inhibicije disanja uspješno primjenjuje od kada je prvi put objavljen, u nekim su slučajevima zabilježeni netočni rezultati, npr. (2) (4) i (5). Tako su u nekim slučajevima krivulje disanja koje su povezane s koncentracijom dvofazne, grafički prikazi doza-odgovor iskrivljeni i vrijednosti EC_{50} neočekivano niske (5). Istraživanja su pokazala da se takvi rezultati dobiju kada dolazi do znatne nitrifikacije aktivnog mulja koji se upotrebljava u ispitivanju i kada ispitivana kemikalija ima veći učinak na oksidaciju amonijaka nego na opću heterotrofnu oksidaciju. Stoga se ti netočni rezultati mogu ispraviti dodatnim ispitivanjem uporabom specifičnog inhibitora nitrifikacije. Mjerenjem brzina potrošnje kisika u prisutnosti i odsutnosti takvog inhibitora, npr. N-aliltiouree (ATU), mogu se odvojeno izračunati brzina ukupne potrošnje kisika, heterotrofne potrošnje kisika i potrošnje kisika nitrifikacijom (4) (7) (8). Tako se mogu odrediti inhibitorni učinci ispitivane kemikalije na oba procesa te se na uobičajen način mogu izračunati vrijednosti EC_{50} za oksidaciju organskog ugljika (heterotrofnu) i za oksidaciju amonijaka (nitrifikaciju). Valja napomenuti da u nekim rijetkim slučajevima inhibitorni učinak N-aliltiouree može biti djelomično ili u cijelosti poništen zbog stvaranja kompleksa s ispitivanim kemikalijama ili dodacima mediju, npr. s ionima Cu^{++} (6). Ioni Cu^{++} ključni su za *Nitrosomonas*, ali su toksični pri većim koncentracijama.

3. Nitrifikacija kod aerobne obrade otpadnih voda, kao nužan korak u postupku uklanjanja dušikovih spojeva iz otpadnih voda denitrifikacijom do plinovitih oblika, postala je prijeko potrebna, posebno u europskim državama; EU je sada odredio niže granice za koncentraciju dušika u pročišćenim otpadnim vodama koje se ispuštaju u prihvatne vode ([1]).

([1]) Direktiva Vijeća 91/271/EEZ od 21. svibnja 1991. o pročišćavanju komunalnih otpadnih voda. SL L 135, 30.5.1991., str. 40.

▼M6

4. U većini slučajeva dostatna je metoda koja se sastoji od procjene učinka samo na procese oksidacije organskog ugljika. Međutim, u nekim je slučajevima za tumačenje rezultata i razumijevanje učinaka potrebno ispitati učinak samo na nitrifikaciju, ili zasebno na nitrifikaciju i na oksidaciju organskog ugljika.

NAČELO ISPITNE METODE

5. Stope disanja uzoraka aktivnog mulja hranjenog sintetičkim otpadnim vodama mjere se u zatvorenoj ćeliji s kisikovom elektrodom nakon vremena kontakta od tri sata. Ovisno o stvarnom scenariju izloženosti, može biti primjeren i dulji kontakt. Ako se ispitivana kemikalija brzo razgrađuje, npr. abiotički hidrolizom, ili je hlapljiva te joj se koncentracija ne može održati na odgovarajući način, može se primijeniti i kraće vrijeme izloženosti, npr. 30 minuta. Odgovarajućom referentnom kemikalijom potrebno je provjeriti osjetljivost svake šarže aktivnog mulja na dan izloženosti. Ispitivanje se obično primjenjuje za određivanje vrijednosti EC_x (npr. EC_{50}) ispitivane kemikalije i/ili najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC).

6. Inhibicija potrošnje kisika mikroorganizama koji oksidiraju organski ugljik može se izraziti odvojeno od inhibicije potrošnje kisika mikroorganizama koji oksidiraju amonijak, i to mjerenjem brzine potrošnje kisika u odsutnosti i u prisutnosti N-aliltiouree, specifičnog inhibitora oksidacije amonijaka u nitrite koju u prvoj fazi provode nitrificirajuće bakterije. U tom slučaju postotak inhibicije brzine potrošnje kisika izračunava se tako da se brzina potrošnje kisika u prisutnosti ispitivane kemikalije usporedi sa srednjom brzinom potrošnje kisika odgovarajućih kontrola koje ne sadržavaju ispitivanu kemikaliju u prisutnosti i u odsutnosti specifičnog inhibitora, N-aliltiouree.

7. Određivanjem brzine potrošnje kisika u mješavinama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju, vodu i sintetičku otpadnu vodu, bez aktivnog mulja, može se otkriti svaka potrošnja kisika koja proizlazi iz abiotičkih procesa.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

8. Trebali bi biti poznati identifikacijski podaci (poželjno je da to bude CAS broj), naziv (IUPAC), čistoća, topljivost u vodi, tlak para, hlapljivost i adsorpcijska svojstva ispitivane kemikalije, kako bi se omogućilo ispravno tumačenje rezultata. Obično se hlapljive kemikalije ne mogu primjereno ispitivati ako se ne poduzmu posebne mjere opreza (vidjeti stavak 21.).

PRIMJENJIVOST ISPITNE METODE

9. Ova se ispitna metoda može primijeniti na kemikalije topljive u vodi, slabo topljive kemikalije i hlapljive kemikalije. Međutim, možda neće uvijek biti moguće dobiti vrijednosti EC_{50} s kemikalijama ograničene topljivosti, a valjani rezultati s hlapljivim kemikalijama mogu se dobiti jedino pod uvjetom da veliki dio (na primjer > 80 %) ispitivane kemikalije ostane u reakcijskoj smjesi na kraju razdoblja izloženosti. Potrebno je dostaviti dodatne analitičke podatke radi bolje procjene vrijednosti koncentracije EC_x ako postoji ikakva nesigurnost u pogledu stabilnosti ili hlapljivosti ispitivane kemikalije.

▼M6

REFERENTNE KEMIKALIJE

10. Referentne kemikalije potrebno je periodično ispitivati kako bi se osiguralo da ispitna metoda i uvjeti ispitivanja budu pouzdani te kako bi se provjerila osjetljivost svake šarže aktiviranog mulja koje se upotrebljava kao mikrobni inokulum na dan izloženosti. Kemikalija 3,5-diklorfenol (3,5-DCP) preporučuje se kao referentna inhibitorna kemikalija jer je poznati inhibitor disanja i upotrebljava se u mnogim vrstama testova inhibicije/toksičnosti (4). Kao referentna kemikalija za inhibiciju ukupnog disanja može se upotrijebiti i bakrov (II) sulfat pentahidrat (9). Kao specifični referentni inhibitor nitrifikacije može se upotrijebiti N-metilanilin (4).

KRITERIJI VALJANOSTI I OBNOVLJIVOST

11. Brzina potrošnje kisika slijepih proba (bez ispitivane kemikalije ili referentne kemikalije) ne bi smjela biti manja od 20 mg kisika po gramu aktivnog mulja (suha masa suspendirane krute tvari) u jednom satu. Ako je brzina manja, test je potrebno ponoviti s ispranim aktivnim muljem ili s muljem iz drugog izvora Koeficijent varijacije brzine potrošnje kisika u kontrolnim ponavljanjima ne bi smio biti veći od 30 % na kraju konačnog testa.

12. Međunarodnim prstenastim testom koji je 2004. organizirao ISO (4) i pri kojemu je upotrijebljen aktivni mulj iz komunalnih otpadnih voda utvrđeno je da se EC_{50} za 3,5-DCP kreće u rasponu od 2 mg/l do 25 mg/l za ukupno disanje, od 5 mg/l do 40 mg/l za heterotrofno disanje i od 0,1 mg/l do 10 mg/l za disanje povezano s nitrifikacijom. Ako EC_{50} za 3,5-DCP nije u očekivanom rasponu, test treba ponoviti s aktivnim muljem iz drugog izvora. EC_{50} za bakrov (II) sulfat pentahidrat mora biti u rasponu od 53 do 155 mg/l za ukupno disanje (9).

OPIS ISPITNE METODE

Ispitne posude i aparatura

13. Potrebno je upotrebljavati uobičajenu laboratorijsku opremu te sljedeće:

(a) ispitne posude – na primjer laboratorijske čaše od 1 000 ml za držanje 500 ml reakcijske smjese (vidjeti 5 na slici 1.);

(b) ćeliju i dodatke za mjerenje koncentracije otopljenog kisika; odgovarajuću kisikovu elektrodu; zatvorenu ćeliju u kojoj se uzorak može držati bez slobodnog prostora iznad njega i zapisivač (npr. 7, 8 i 9 na slici 1. u Dodatku 2.); druga je mogućnost uporaba boce BPK s odgovarajućim cijevnim adaptorom za pričvršćivanje kisikove elektrode za grlo boce (vidjeti sliku 2. u Dodatku 3.). Kako bi se spriječio gubitak tekućine zbog prelijevanja tijekom umetanja kisikove elektrode, preporučljivo je prvo umetnuti lijevak ili staklenu cjevčicu ili upotrijebiti posude s izvijenim rubovima. U oba je slučaja potrebno upotrijebiti magnetsku miješalicu ili neku drugu metodu miješanja, npr. samomiješajuću sondu;

(c) magnetske miješalice i magnetske štapiće obložene inertnim materijalom, za uporabu u mjernoj komori i/ili u ispitnim posudama;

(d) uređaj za dozračivanje: komprimirani zrak potrebno je prema potrebi propustiti kroz odgovarajući filtar kako bi se uklonila prašina i ulje te kroz boce za ispiranje koje sadržavaju vodu kako bi se zrak ovlažio. Sadržaj posuda potrebno je dozračivati s pomoću staklenih konusnih pipeta ili drugih naprava za dozračivanje koje ne izazivaju adsorpciju kemikalija. Može se upotrijebiti orbitalna tresilica s brzinom tresenja

▼M6

između 150 i 250 rpm, s tikvicama kapaciteta npr. 2 000 ml, kako bi se zadovoljila potreba mulja za kisikom te nadvladale poteškoće kod kemikalija koje stvaraju veliku pjenu, hlapljive su i stoga se gube ili teško dispergiraju kad se dozračuju propuhivanjem zraka. Ispitni se sustav obično sastoji od određenog broj laboratorijskih čaša koje se neprekidno dozračuju u utvrđenim vremenskim razmacima (npr. u razmacima od 10 do 15 minuta) te se potom sekvencijski analiziraju. Mogu se upotrijebiti i validirani instrumenti koji omogućuju istodobno dozračivanje i mjerenje brzine potrošnje kisika u smjesama;

(e) pH-metar;

(f) centrifugu, klasičnu stolnu centrifugu za mulj koja može postići 10 000 m/s^2.

Reagensi

14. Tijekom cijelog testa potrebno je upotrebljavati reagense analitičke čistoće.

Voda

15. Potrebno je upotrebljavati destiliranu ili deioniziranu vodu koja sadržava manje od 1 mg/l DOC-a, osim ako se nalaže uporaba vode iz slavine koja ne sadržava klor.

Sintetička otpadna voda

16. Medij se pripremi tako da sadržava sljedeće sastojke u navedenim količinama:

— pepton	16 g
— mesni ekstrakt (ili usporedivi biljni ekstrakt)	11 g
— ureu	3 g
— natrijev klorid (NaCl)	0,7 g
— kalcijev klorid dihidrat ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— bezvodni kalijev monohidrogenfosfat (K_2HPO_4)	2, 8 g
— destiliranu ili deioniziranu vodu do 1l	

17. pH ove otopine mora biti 7,5 ± 0,5. Ako se pripremljeni medij ne upotrijebi odmah, treba ga čuvati u mraku na temperaturi od 0 °C do 4 °C najviše tjedan dana ili u uvjetima koji neće promijeniti njegov sastav. Valja napomenuti da je ova sintetička otpadna voda stostruki koncentrat vode opisane u tehničkom izvješću OECD-a „Predložena metoda za određivanje biorazgradivosti surfaktanata koji se upotrebljavaju u sintetičkim deterdžentima” od 11. lipnja 1976. s dodatkom dikalijevog hidrogenfosfata.

▼M6

18. Druga je mogućnost da se sastojci medija pojedinačno steriliziraju prije skladištenja ili da se pepton i mesni ekstrakt dodaju neposredno prije ispitivanja. Prije uporabe medij je potrebno temeljito promiješati i njegov pH prema potrebi prilagoditi na pH 7,5 ± 0,5.

Ispitivana kemikalija

19. Radna se otopina priprema za ispitivane tvari koje su lako topljive u vodi, i to samo do maksimalne topljivosti u vodi (taloženje nije prihvatljivo). Tvari koje se slabo otapaju u vodi, smjese čiji sastojci imaju različitu topljivost u vodi i adsorptivne tvari potrebno je odmjeriti izravno u ispitne posude. U tim slučajevima uporaba radnih otopina može biti valjana opcija ako se otopljene koncentracije ispitivanih kemikalija analitički određuju u ispitnim posudama (prije dodavanja aktivnog mulja). Analitičko određivanje otopljenih koncentracija ispitivanih kemikalija u ispitnim posudama ključno je i u slučaju kad se pripremaju frakcije WAF (engl. *water accommodated fractions*, WAF). Treba izbjegavati uporabu organskih otapala, dispergenata/emulgatora za pospješivanje topljivosti. Obrada radnih otopina i suspenzija ultrazvukom, npr. preko noći, moguća je ako postoje odgovarajući podaci koji govore o stabilnosti ispitivane kemikalije u takvim uvjetima.

20. Ispitivana kemikalija može štetno utjecati na pH unutar ispitnog sustava. Prije postavljanja testa potrebno je provesti preliminarni pokus za određivanje pH-vrijednosti smjese kojoj je dodana ispitivana kemikalija kako bi se utvrdilo hoće li trebati prilagoditi pH prije glavnog testa i ponovno na dan glavnog testa. Vodene otopine / suspenzije ispitivane kemikalije treba prema potrebi neutralizirati prije dodavanja inokuluma. Međutim, s obzirom na to da neutralizacija može promijeniti kemijska svojstva kemikalije, mogu se provesti dodatna ispitivanja, ovisno o svrsi istraživanja, kako bi se procijenio učinak ispitivane kemikalije na mulj bez prilagođavanja pH-vrijednosti.

21. Toksični učinci hlapljivih kemikalija, posebno u testovima u kojima se kroz sustav upuhuju mjehurići zraka, mogu biti različitog intenziteta zbog gubitka tvari tijekom razdoblja izloženosti. Kod takvih je tvari potreban oprez, što znači da je kontrolne smjese koje sadržavaju predmetnu tvar potrebno podvrgnuti analizi specifičnoj za tu tvar te prilagoditi režim dozračivanja.

Referentna kemikalija

22. Ako se kao referentna kemikalija upotrebljava 3,5-diklofenol, treba pripremiti otopinu od 1,00 g 3,5-diklofenola u 1 000 ml vode (15). Treba primijeniti toplu vodu i/ili ultrazvuk kako bi se ubrzalo otapanje i kako bi otopina dobila konačan volumen nakon što se ohladi na sobnu temperaturu. Međutim, treba osigurati da struktura referentne kemikalija ostane nepromijenjena. Treba provjeriti pH otopine i prema potrebi ga prilagoditi s NaOH ili H_2SO_4 na pH 7 – 8.

23. Ako se kao referentna kemikalija upotrebljava bakrov (II) sulfat pentahidrat, upotrebljavaju se koncentracije od 58 mg/l, 100 mg/l i 180 mg/l (faktor 1,8). Tvar je potrebno odvagati izravno u ispitne posude (29 – 50 – 90 mg za 500 ml ukupnog volumena). Potom se otapa s 234 ml vode iz slavine sterilizirane u autoklavu. Bakrov (II) sulfat pentahidrat lako se otapa. Kad započne test, dodaje se 16 ml sintetičke otpadne vode i 250 ml aktivnog mulja.

▼M6

Specifični inhibitor nitrifikacije

24. Treba pripremiti radnu otopinu N-aliltiouree (ATU) u koncentraciji od 2,32 g/l. Dodavanjem 2,5 ml te radne otopine u inkubacijsku smjesu konačnog volumena 500 ml dobije se konačna koncentracija od 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), za koju je poznato da je dovoljna (4) za izazivanje 100-postotne inhibicije nitrifikacije u nitrificirajućem aktivnom mulju koji sadržava 1,5 g/l suspendirane krute tvari.

Abiotička kontrola

25. U nekim rijetkim uvjetima ispitivana kemikalija s jakim reducirajućim svojstvima može uzrokovati mjerljivu abiotičku potrošnju kisika. U tim su slučajevima potrebne abiotičke kontrole kako bi se mogla razlikovati abiotička potrošnja kisika ispitivane kemikalije i mikrobno disanje. Abiotičke kontrole mogu se pripremiti izostavljanjem inokuluma iz ispitne smjese. Isto tako, abiotičke kontrole bez inokuluma mogu se uključiti i pri dodatnim analitičkim mjerenjima koja se provode radi određivanja koncentracije postignute tijekom ispitne faze izloženosti, npr. kad se upotrebljavaju radne otopine kemikalija koje su slabo topljive u vodi s komponentama različite topljivosti u vodi. U nekim posebnim slučajevima možda će biti potrebno pripremiti abiotičku kontrolu sa steriliziranim inokulumom (npr. obradom u autoklavu ili dodavanjem sterilizirajućih toksikanata). Neke kemikalije mogu proizvoditi ili trošiti kisik jedino ako je površina dovoljno velika za reakciju, čak i ako im je za to obično potrebna mnogo veća temperatura ili tlak. U tom pogledu posebnu pozornost treba posvetiti peroksi-tvarima. Sterilizirani inokulum predstavlja veliku površinu.

Inokulum

26. Za opću je uporabu aktivni mulj potrebno prikupiti na izlazu iz aeracijskog bazena ili u blizini izlaza iz aeracijskog bazena ispravnog postrojenja za pročišćavanje koje pretežno pročišćava komunalne otpadne vode. Ovisno o svrsi ispitivanja, mogu se upotrebljavati i druge odgovarajuće vrste ili izvori aktivnog mulja, npr. mulj uzgojen u laboratoriju, s odgovarajućom koncentracijom suspendirane krute tvari od 2 g/l do 4 g/l. Međutim, muljevi iz različitih postrojenja za pročišćavanje vjerojatno će imati različita svojstva i različitu osjetljivost.

27. Mulj se može upotrijebiti onakav kakav je sakupljen, ali se grube čestice moraju ukloniti kratkim taloženjem, npr. pet do 15 minuta, i pretakanjem gornjeg sloja koji sadržava finije čestice ili prosijavanjem (npr. kroz sito veličine otvora 1 mm^2). Druga je mogućnost da se mulj homogenizira u miješalici oko 15 sekundi ili dulje, pri čemu je potreban oprez u pogledu smičnih sila i promjene temperature do koje može doći pri dugotrajnom miješanju.

28. Često je potrebno oprati mulj, npr. ako je stopa endogenog disanja niska. Mulj je prvo potrebno centrifugirati dovoljno dugo da nastane jasan supernatant i talog krute tvari mulja, npr. deset minuta brzinom od oko 10 000 m/s^2. Tekući supernatant treba ukloniti te mulj ponovno suspendirati tresenjem u vodi iz slavine koja ne sadržava klor; vodu za pranje potom treba ponovno centrifugirati i odbaciti te je time ukloniti. Ako je potrebno, postupak centrifugiranja i pranja može se ponoviti. Treba odrediti suhu masu poznatog volumena resuspendiranog mulja te mulj koncentrirati uklanjanjem tekuće frakcije ili dodatnim razrjeđivanjem u vodi iz slavine koja ne

▼M6

sadržava klor da se dobije potrebna koncentracija suhe tvari mulja od 3 g/l. Aktivni mulj treba neprestano dozračivati (npr. brzinom od 2 l/min) na ispitnoj temperaturi i, ako je moguće, upotrijebiti na dan skupljanja. Ako to nije moguće, mulj je potrebno još dva dana svakodnevno hraniti sintetičkom otpadnom vodom (50 ml sintetičke otpadne vode / l l aktivnog mulja). Mulj se potom upotrebljava za ispitivanje i rezultati se prihvaćaju kao valjani pod uvjetom da se aktivnost mulja nije značajno promijenila, što se procjenjuje brzinom endogenog heterotrofnog disanja i brzinom disanja povezanog s nitrifikacijom.

29. Poteškoće se mogu javiti ako tijekom inkubacije dođe do tolikog pjenjenja da pjena i krute tvari nošene njome izlaze iz posuda za dozračivanje. Ponekad je pjenjenje jednostavno posljedica prisutnosti sintetičke otpadne vode pa ga treba predvidjeti ako je ispitivana kemikalija površinski aktivna tvar ili sadržava površinski aktivnu tvar. Gubitak krute tvari mulja iz ispitivanih smjesa dovest će do umjetno sniženih stopa disanja koje bi se mogle pogrešno tumačiti kao učinak inhibicije. Osim toga, dozračivanje otopine površinski aktivne tvari dovodi do skupljanja površinski aktivne tvari u sloju pjene; gubitak pjene iz ispitnog sustava imat će za posljedicu smanjenje koncentracija izlaganja. Pjenjenje se može kontrolirati jednostavnim mehaničkim metodama (npr. povremenim ručnim miješanjem s pomoću staklenog štapića) ili dodavanjem sredstva protiv pjenjenja u obliku silikonske emulzije koja ne sadržava površinski aktivne tvari i/ili primjenom metode dozračivanja protresanjem u tikvici. Ako je problem povezan s prisutnošću sintetičke otpadne vode, treba promijeniti sastav otpadne vode dodavanjem reagensa protiv pjenjenja u količini od npr. 50 µl/l. Ako je ispitivana kemikalija ta koja uzrokuje pjenjenje, količinu potrebnu za smanjenje pjene treba odrediti pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji i potom svaku pojedinačnu posudu za dozračivanje treba tretirati istom količinom (uključujući i one kod kojih nema pjene, npr. slijepe probe i referentne posude). Ako se upotrebljavaju sredstva protiv pjenjenja, ne smije postojati interakcija s inokulumom i/ili ispitivanom kemikalijom.

POSTUPAK ISPITIVANJA

30. Može se odrediti inhibicija triju različitih vrsta potrošnje kisika, i to ukupne potrošnje, samo heterotrofne i one do koje dolazi zbog nitrifikacije. Obično je dovoljno izmjeriti inhibiciju ukupne potrošnje kisika. Učinke na heterotrofnu potrošnju kisika koja je povezana s oksidacijom organskog ugljika i onu koja nastaje zbog oksidacije amonijaka potrebno je odrediti ako se za određenu kemikaliju posebno zahtijeva određivanje tih dviju odvojenih krajnjih točaka ili (neobvezatno) kako bi se objasnile atipične krivulje doza-odgovor dobivene mjerenjem inhibicije ukupne potrošnje kisika.

Uvjeti ispitivanja

31. Ispitivanje je potrebno provoditi na temperaturi od 20 ± 2 °C.

Ispitne smjese

32. Ispitne smjese (F_T kao u tablici 1.) koje sadržavaju vodu, sintetičku otpadnu vodu i ispitivanu kemikaliju treba pripremiti tako da se dobiju različite nazivne koncentracije ispitivane kemikalije (u tablici 1. vidjeti primjere volumena sastojaka). Prema potrebi, pH bi trebalo prilagoditi na 7,5 ± 0,5; smjese treba razrijediti vodom te dodati inokulum tako da se dobiju jednaki konačni volumeni u posudama i da se započne s dozračivanjem.

Referentne smjese

33. Smjese (F_R) treba pripremiti na isti način kao i ispitne smjese, s tim da se ispitivana kemikalija zamijeni referentnom kemikalijom, npr. 3,5-diklorfenolom.

▼M6

Slijepe probe

34. Kod ispitivanja u kojima se ispitne čaše pripremaju jedna poslije druge u određenim vremenskim razmacima, slijepe probe (F_B) treba pripremiti na početku i na kraju razdoblja izlaganja. U ispitivanjima koja se provode s pomoću opreme koja omogućuje istodobna mjerenja različitih potrošnja kisika u svaku seriju istodobne analize treba uključiti najmanje dvije slijepe probe. Slijepe probe sadržavaju jednak volumen aktivnog mulja i sintetičkog medija, ali ne sadržavaju ispitivanu ili referentnu kemikaliju. Treba ih razrijediti vodom do istog volumena kao i ispitne i referentne smjese.

Abiotička kontrola

35. Ako je potrebno, primjerice ako je poznato ili se sumnja da ispitivana kemikalija ima jaka reducirajuća svojstva, treba pripremiti smjesu F_A za mjerenje abiotičke potrošnje kisika. Smjesa mora imati iste količine ispitivane kemikalije i sintetičke otpadne vode te isti volumen kao ispitivane smjese, ali ne smije sadržavati aktivni mulj.

Opći postupci i mjerenja

36. Ispitne smjese, referentne smjese, slijepe probe i abiotičke kontrole inkubiraju se na ispitnoj temperaturi u uvjetima prisilnog dozračivanja (0,5 do 1 l/min) tako da se koncentracija otopljenog kisika održi iznad 60 do 70 % zasićenosti te da se pahulje mulja zadrže u suspenziji. Da bi se pahulje mulja zadržale u suspenziji, potrebno je isto tako promiješati kulture. Smatra se da inkubacija započinje u trenutku kada inokulum od aktivnog mulja dođe u dodir s ostalim sastojcima konačne smjese. Na kraju inkubacije, to jest nakon vremena izloženosti koje se obično utvrđuje na tri sata, uzimaju se uzorci kako bi se izmjerila brzina smanjenja koncentracije otopljenog kisika u ćeliji predviđenoj za tu svrhu (slika 2. u Dodatku 3.) ili u potpuno napunjenoj boci BPK. Način započinjanja inkubacija ovisi i o kapacitetu opreme koja se upotrebljava za mjerenje stope potrošnje kisika. Na primjer, ako oprema uključuje samo jednu sondu za mjerenje kisika, mjerenja se provode pojedinačno. U tom slučaju različite smjese potrebne za ispitivanje treba pripremiti sa sintetičkom otpadnom vodom bez dodavanja inokuluma te potom u svaku posudu serije treba dodati potrebnu količinu mulja. Inkubacije treba započinjati jednu za drugom, u prikladnim vremenskim razmacima od npr. 10 do 15 minuta. Alternativno, sustav mjerenja može se sastojati od više sondi koje omogućuju više istodobnih mjerenja; u tom se slučaju inokulum može istodobno dodati u odgovarajuće skupine posuda.

37. Nazivna koncentracija aktivnog mulja u svim ispitnim smjesama, referentnim smjesama i smjesama za slijepu probu (ali ne za abiotičku kontrolu) iznosi 1,5 g suspendirane krute tvari po litri. Potrošnju kisika treba izmjeriti nakon tri sata izloženosti. Prema potrebi treba provesti dodatna mjerenja nakon 30-minutne izloženosti, i to kako je opisano u stavku 5.

Nitrifikacijski potencijal mulja

38. Da bi se odredilo dolazi li do nitrifikacije mulja te, ako dolazi, kojom brzinom, treba pripremiti smjese (F_B) kao kod slijepe probe i dodatne „kontrolne” smjese (F_N) koje sadržavaju i N-aliltioureu u količini od 11,6 mg/l.

▼M6

Smjese treba dozračiti i inkubirati na 20° ± 2 °C tri sata. Potom treba izmjeriti brzine potrošnje kisika te izračunati brzinu potrošnje kisika zbog nitrifikacije.

Plan ispitivanja

Ispitivanje za određivanje raspona

39. Kada je to potrebno, provodi se preliminarno ispitivanje kako bi se procijenio raspon koncentracija ispitivane kemikalije koje će se upotrebljavati u glavnom ispitivanju za određivanje inhibicije potrošnje kisika. Alternativno, odsutnost inhibicije potrošnje kisika ispitivane kemikalije u preliminarnom ispitivanju može ukazati na to da nije potrebno provoditi glavno ispitivanje, ali moraju biti uključena tri ponavljanja s najvećom ispitivanom koncentracijom iz preliminarnog ispitivanja (obično 1 000 mg/l, ali ta vrijednost ovisi o zahtijevanim podacima).

Tablica 1.

Primjeri smjesa za preliminarno ispitivanje

Reagens	Izvorna koncentracija				
Radna otopina ispitivane kemikalije	10 g/l				
Radna otopina sintetičkog medija	Vidjeti stavak 16.				
Radna suspenzija aktivnog mulja	3 g suspendirane krute tvari po litri				
Komponente smjese	Doziranje u ispitne posude [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Radna otopina ispitivane kemikalije (ml) (stavci od 19. do 21.)	0,5	5	50	0	50
Radna otopina sintetičke otpadne vode (ml) (stavak 16.)	16	16	16	16	16
Suspenzija aktivnog mulja (ml) (stavci od 26. do 29.)	250	250	250	250	0
Voda (stavak 15.)	233,5	229	184	234	434
Ukupni volumen smjese (ml)	500	500	500	500	500
Koncentracija u smjesi					
Ispitna suspenzija (mg/l) Aktivni mulj	10	10	1 000	0	1 000
(suspendirana kruta tvar (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Isti postupak treba primijeniti i s referentnom kemikalijom da bi se dobile tikvice F_{R1-3}

40. Ispitivanje je potrebno provesti s najmanje tri koncentracije ispitivane kemikalije, na primjer, 10 mg/l, 100 mg/l i 1 000 mg/l sa slijepom probom i, ako je potrebno, s najmanje tri abiotičke kontrole s najvećim koncentracijama ispitivane kemikalije (kao primjer vidjeti tablicu 1.). U idealnom slučaju najniža koncentracija ne smije utjecati na potrošnju kisika. Treba izračunati

▼M6

brzine potrošnje kisika i brzinu nitrifikacije, prema potrebi; potom se izračunava postotak inhibicije. Ovisno o svrsi ispitivanja, moguće je jednostavno odrediti toksičnost granične koncentracije, npr. 1 000 mg/l. Ako se pri toj koncentraciji ne javlja statistički značajan učinak, nije potrebno daljnje ispitivanje s višim ili nižim koncentracijama. Valja napomenuti da tvari koje se slabo otapaju u vodi, smjese čiji sastojci imaju različitu topljivost u vodi i adsorptivne tvari treba odvagati izravno u ispitne posude. U tom slučaju volumen rezerviran za radnu otopinu ispitne tvari treba zamijeniti vodom za razrjeđivanje.

Glavno ispitivanje

Inhibicija ukupne potrošnje kisika

41. Za ispitivanje treba upotrijebiti raspon koncentracija određen preliminarnim ispitivanjem. Da bi se dobili NOEC i EC_x (npr. EC_{50}), u većini slučajeva preporučuje se šest kontrola i pet ispitnih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu, s pet ponavljanja. Abiotičku kontrolu nije potrebno ponavljati ako u preliminarnom testu nije bilo potrošnje kisika; međutim, u slučaju značajne potrošnje kisika abiotičke kontrole treba uključiti za svaku koncentraciju ispitivane kemikalije. Osjetljivost mulja treba provjeriti uporabom referentne kemikalije, 3,5-diklorfenola. Osjetljivost mulja treba provjeriti za svaki ispitni niz jer je poznato da osjetljivost nije postojana. U svakom slučaju, uzorci se uzimaju iz ispitnih posuda nakon tri sata, i prema potrebi nakon dodatnih 30 minuta, kako bi se izmjerila brzina potrošnje kisika u ćeliji s kisikovom elektrodom. Iz prikupljenih podataka izračunavaju se specifične stope disanja kontrolnih i ispitnih smjesa; potom se prema jednadžbi 7. navedenoj u nastavku izračunava postotak inhibicije.

Razlikovanje inhibicije heterotrofnog disanja od nitrifikacije

42. Uporaba specifičnog inhibitora nitrifikacije, ATU-a, omogućuje izravnu procjenu inhibitornih učinaka ispitivanih kemikalija na heterotrofnu oksidaciju te se oduzimanjem brzine potrošnje kisika u prisutnosti ATU-a od brzine ukupne potrošnje (kad nije prisutan ATU) mogu izračunati učinci na stopu nitrifikacije. Treba pripremiti dva seta reakcijskih smjesa prema planovima ispitivanja za EC_x ili NOEC opisanima u stavku 41., s tim da u svaku smjesu jednog seta treba k tome dodati ATU u konačnoj koncentraciji od 11,6 mg/l, za koju je dokazano da u potpunosti inhibira nitrifikaciju u mulju koji sadržava koncentracije suspendirane krute tvari do 3 000 mg/l (4). Brzinu potrošnje kisika treba izmjeriti nakon razdoblja izloženosti; te izravne vrijednosti predstavljaju samo heterotrofno disanje, a razlika između tih vrijednosti i odgovarajuće stope ukupnog disanja predstavlja nitrifikaciju. Potom se izračunavaju različiti stupnjevi inhibicije.

Mjerenja

43. Nakon razdoblja izloženosti uzorak iz prve posude za dozračivanje treba prenijeti u ćeliju opremljenu kisikovom elektrodom (slika 1. u Dodatku 2.) i treba odmah izmjeriti koncentraciju otopljenog kisika. Ako je na raspolaganju sustav s više elektroda, mjerenja se mogu izvršiti istodobno. Ključno je da miješanje (s pomoću obloženog magneta) bude istom brzinom kao što je ona koja je primijenjena pri kalibraciji elektrode, kako bi se osiguralo da

▼M6

sonda reagira s najmanjim mogućim zakašnjenjem na promjene koncentracije kisika te kako bi se omogućila redovita i ponovljiva mjerenja kisika u mjernoj posudi. Obično je prikladan sustav kisikove elektrode koji se sastoji od samomiješajuće sonde. Ćeliju je između mjerenja potrebno isprati vodom. Druga je mogućnost da se uzorak stavi u bocu BPK (slika 2. u Dodatku 3.) postavljenu na magnetsku miješalicu. Potom se u grlo boce umetne kisikova sonda s cijevnim adapterom te se pokrene magnetska miješalica. U oba slučaja koncentraciju otopljenog kisika treba neprestano mjeriti i bilježiti u razdoblju od obično pet do deset minuta ili dok koncentracija kisika ne padne ispod 2 mg/l. Elektroda se potom uklanja i smjesa se vraća u posudu za dozračivanje, u kojoj se nastavlja s dozračivanjem i miješanjem ako je potrebno mjerenje nakon duljih razdoblja izloženosti.

Provjera koncentracije ispitivane kemikalije

44. Za neke je svrhe ponekad potrebno izmjeriti koncentraciju ispitivane kemikalije u ispitnim posudama. Valja napomenuti da ako se upotrebljavaju radne otopine:

— tvari koje se slabo otapaju u vodi,

— smjesa čiji sastojci imaju različitu topljivost u vodi ili

— tvari koje se dobro otapaju u vodi, ali je koncentraciju radne otopine blizu maksimalne topljivosti u vodi,

otopljena frakcija nije poznata te je nepoznata i stvarna koncentracija ispitivane kemikalije prenesene u ispitne posude. Kako bi se odredila svojstva izloženosti, potrebno je analitički procijeniti koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama. Radi jednostavnosti, analitičku procjenu treba izvršiti prije dodavanja inokuluma. Zbog činjenice da se u ispitne posude prenose samo otopljene frakcije, izmjerene koncentracije mogu biti vrlo niske.

45. Da bi se izbjegle dugotrajne i skupe analize, preporučuje se jednostavno odmjeriti ispitivanu kemikaliju izravno u ispitne posude te se u kasnijim izračunima oslanjati na ponderiranu početnu nazivnu koncentraciju. Nije potrebno razlikovanje između otopljenih, neotopljenih i adsorbiranih frakcija, jer se u stvarnim uvjetima sve te frakcije slično javljaju u postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda i mogu varirati ovisno o sastavu otpadne vode. Cilj je ove ispitne metode realno procijeniti neinhibitornu koncentraciju i nije prikladna za detaljno istraživanje o tome koje frakcije pridonose inhibiciji organizama u aktivnom mulju. Naposljetku, i tvari koje imaju adsorpcijska svojstva treba odmjeriti izravno u ispitne posude; posude moraju biti silanizirane kako bi se gubitak adsorpcijom sveo na najmanju moguću mjeru.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Izračun brzina potrošnje kisika

46. Brzinu potrošnje kisika treba izračunati iz srednje vrijednosti izmjerenih veličina, npr. iz linearnog dijela grafa koji prikazuje koncentraciju kisika u odnosu na vrijeme, pri čemu se izračun ograničava na koncentracije kisika između 2,0 mg/l i 7,0 mg/l, jer više i niže koncentracije same po sebi mogu utjecati na brzinu potrošnje. Ponekad je neizbježno i potrebno upotrijebiti vrijednosti koncentracije koje su ispod ili iznad navedenih granica, na

▼M6

primjer kada je disanje jako suprimirano i stoga vrlo sporo ili ako određeni aktivni mulj diše vrlo brzo. To je prihvatljivo pod uvjetom da su predmetni dijelovi grafa potrošnje linearni i da se njihovi gradijenti ne mijenjanju dok prolaze kroz granične vrijednosti od 2,0 mg/l ili 7,0 mg/l O_2. Svi nelinearni dijelovi grafa ukazuju na to da se sustav mjerenja stabilizira ili da se brzina potrošnje mijenja te ih se ne smije upotrijebiti za izračun brzina potrošnje. Brzinu potrošnje kisika treba izraziti u miligramima po litri po satu (mg/lh) ili miligramima po gramu suhog mulja po satu (mg/gh). Brzina potrošnje kisika, R, u mg/lh, može se izračunati ili interpolirati iz linearnog dijela zabilježenog grafa smanjenja kisika prema jednadžbi (1):

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1),$$

gdje je:

Q_1 = koncentracija kisika na početku odabranog linearnog dijela grafa (mg/l);

Q_2 = koncentracija kisika na kraju odabranog linearnog dijela grafa (mg/l);

Δ_t = vremenski interval između tih dvaju mjerenja (min).

47. Specifična stopa disanja (R_s) iskazuje se kao količina kisika potrošenog po gramu suhe mase mulja po satu (mg/gh) prema jednadžbi (2):

$$R_s = R/SS \qquad (2),$$

gdje je SS koncentracija suspendirane krute tvari u ispitnoj smjesi (g/l).

48. Mogu se kombinirati sljedeći pokazatelji za R:

S specifična stopa,

T stopa ukupnog disanja,

N stopa disanja povezanog s nitrifikacijom,

H stopa heterotrofnog disanja,

A stopa povezana s abiotičkim procesima,

B stopa na temelju slijepih proba (srednja).

Izračun brzine potrošnje kisika zbog nitrifikacije

49. Odnos između ukupnog disanja (R_T), disanja povezanog s nitrifikacijom (R_N) i heterotrofnog disanja (R_H) prikazan je jednadžbom (3):

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3),$$

gdje je:

R_N= brzina potrošnje kisika zbog nitrifikacije (mg/lh);

R_T= izmjerena brzina potrošnje kisika kod slijepe probe (bez ATU-a; F_B) (mg/lh);

R_H= izmjerena brzina potrošnje kisika kod slijepe probe kojoj je dodan ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Navedeni odnos vrijedi za vrijednosti slijepih proba (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotičke kontrole (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) i pokuse s ispitivanim kemikalijama (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Specifične stope disanja izračunavaju se iz:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4),$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5),$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6).$$

51. Ako je u preliminarnom testu R_N značajan (npr. < 5 % R_T-a slijepih proba), može se pretpostaviti da je heterotrofna potrošnja kisika jednaka ukupnoj potrošnji i da nema nitrifikacije. Ako je ispitivanjima potrebno razmotriti učinke na heterotrofne i nitrificirajuće mikroorganizme, potreban je drugi izvor aktivnog mulja. Glavno se ispitivanje provodi ako postoje dokazi o supresiji brzina potrošnje kisika ovisno o koncentracijama ispitivane kemikalije.

Izračun postotka inhibicije

52. Postotak inhibicije, I_T, ukupne potrošnje kisika pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije prikazan je jednadžbom (7):

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA}) / R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7).$$

53. Isto tako, postotak inhibicije heterotrofne potrošnje kisika, I_H, pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije prikazan je jednadžbom (8):

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] / 100\ \% \quad (8).$$

54. Konačno, inhibicija potrošnje kisika zbog nitrifikacije, I_N, pri svakoj koncentraciji prikazana je jednadžbom (9):

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9).$$

55. Postotak inhibicije potrošnje kisika potrebno je grafički prikazati u odnosu prema logaritmu koncentracije ispitivane kemikalije (krivulja inhibicije, vidjeti sliku 3. u Dodatku 4.). Krivulje inhibicije grafički se prikazuju za svako razdoblje dozračivanja od tri sata ili dodatno nakon 30 minuta. Koncentraciju ispitivane kemikalije koja inhibira potrošnju kisika za 50 % (EC_{50}) treba izračunati ili interpolirati iz grafa. Ako su na raspolaganju odgovarajući podaci, mogu se izračunati ili interpolirati 95-postotne granice pouzdanosti za EC_{50}, nagib krivulje te odgovarajuće vrijednosti koje označuju početak inhibicije (na primjer EC_{10} ili EC_{20}) i kraj inhibicije (na primjer EC_{80} ili EC_{90}).

56. Valja napomenuti da zbog često uočavane varijabilnosti rezultata u mnogim slučajevima može biti dovoljno iskazati rezultate prema redu veličine, na primjer:

EC_{50} < 1 mg/l,

EC_{50} 1 mg/l do 10 mg/l,

EC_{50} 10 mg/l do 100 mg/l,

EC_{50} > 100 mg/l.

Tumačenje rezultata

EC_x

▼M6

57. Vrijednosti EC_x te njihove niže i više 95-postotne granice pouzdanosti za parametar izračunavaju se odgovarajućim statističkim metodama (npr. probit-analizom, logističkom ili Weibullovom funkcijom, modificiranom Spearman-Karberovom metodom ili jednostavnom interpolacijom (11)). EC_x se dobiva tako da se u dobivenu jednadžbu uvrsti vrijednost koja odgovara x % kontrolne srednje vrijednosti. Da bi se izračunao EC_{50} ili bilo koji drugi EC_x, srednje vrijednosti izračunane za svaki tretman (x) potrebno je podvrgnuti regresijskoj analizi.

Procjena NOEC-a

58. Ako se za određivanje NOEC-a namjerava primijeniti statistička analiza, potrebni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Treba primijeniti odgovarajuće statističke metode u skladu s OECD-ovim dokumentom „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (11). Općenito, štetni učinci ispitivane kemikalije u usporedbi s kontrolom istražuju se jednosmjernim testiranjem hipoteza za $p \leq 0,05$.

Izvješće o ispitivanju

59. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, čistoća,

— fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije (npr. log K_{ow}, topljivost u vodi, tlak pare, Henryjeva konstanta (H) i moguće informacije o sudbini ispitivane kemikalije, npr. adsorpciji na aktivni mulj);

Sustav ispitivanja

— izvor, uvjeti rada postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i ulazna voda koju prima, koncentracija, prethodna obrada i održavanje aktivnog mulja;

Uvjeti ispitivanja

— ispitna temperatura, pH tijekom ispitivanja i trajanje faze (faza) ispitivanja;

Rezultati

— specifična potrošnja kisika kod kontrola (mg O2/(g mulja × h),

— svi izmjereni podaci, krivulja (krivulje) inhibicije i metoda izračuna EC_{50},

— EC_{50} i, po mogućnosti, 95-postotne granice pouzdanosti, po mogućnosti EC_{20}, EC_{80}; po mogućnosti NOEC i primijenjene statističke metode ako se EC_{50} ne može odrediti,

— rezultati za ukupnu inhibiciju i, ako je primjereno, za heterotrofnu inhibiciju te inhibiciju povezanu s nitrifikacijom,

— abiotička potrošnja kisika u fizikalno-kemijskoj kontroli (ako je primijenjena),

— naziv referentne kemikalije i rezultati dobiveni s tom kemikalijom,

— sva zapažanja i odstupanja od standardnog postupka koja su mogla utjecati na rezultat.

LITERATURA

(1) Brown, D., Hitz, H. R. i Schäfer, L. (1981.) The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245 – 261.

▼M6

(2) King, E. F. i Painter H. A. (1986.). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27 – 39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003.) Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H. A, Jones, K. (1963.) The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471 – 483.

(7) Painter, H. A. (1986.) Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976.) Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. i Noack, U. (2004.) The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556 – 1557.

(10) ISO (1995.) ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006.) Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Pariz.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode primjenjuju se sljedeće definicije.

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

ECx (koncentracija s učinkom od x %) je koncentracija koja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u određenom razdoblju izloženosti, u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da proizvodi učinak na ispitivani parametar kod 50 % izložene populacije u definiranom razdoblju izloženosti.

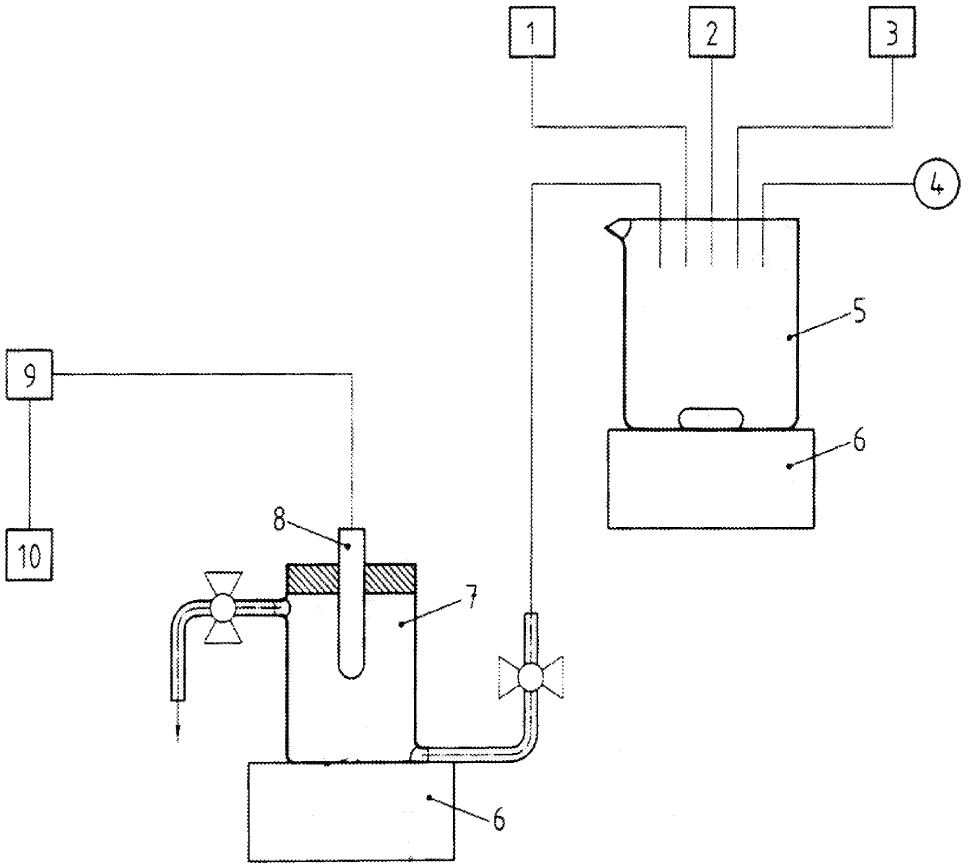
NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka) koncentracija je ispitivane kemikalije kod koje nije uočen nikakav učinak. Kod ovog ispitivanja koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar određenog razdoblja izloženosti u usporedbi s kontrolom.

Ispitivana kemikalija znači sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼**M6**

Dodatak 2.

Slika 1. **Primjeri naprave za mjerenje**



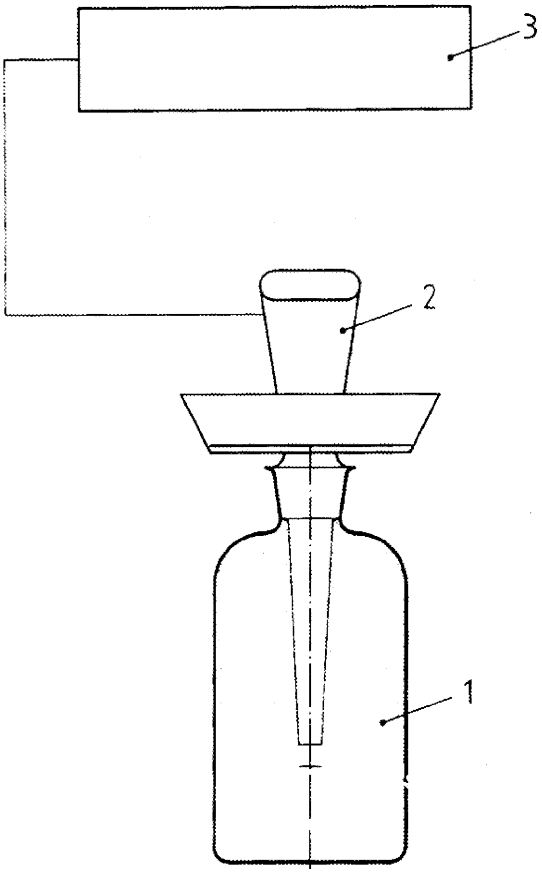
Legenda

1	aktivni mulj	6	magnetska miješalica
2	sintetički medij	7	ćelija za mjerenje kisika
3	ispitivana kemikalija	8	kisikova elektroda
4	zrak	9	instrument za mjerenje kisika
5	posuda za miješanje	10	zapisivač

▼**M6**

Dodatak 3.

Slika 2. **Primjer naprave za mjerenje s bocom BPK**



Legenda

1 ispitna posuda

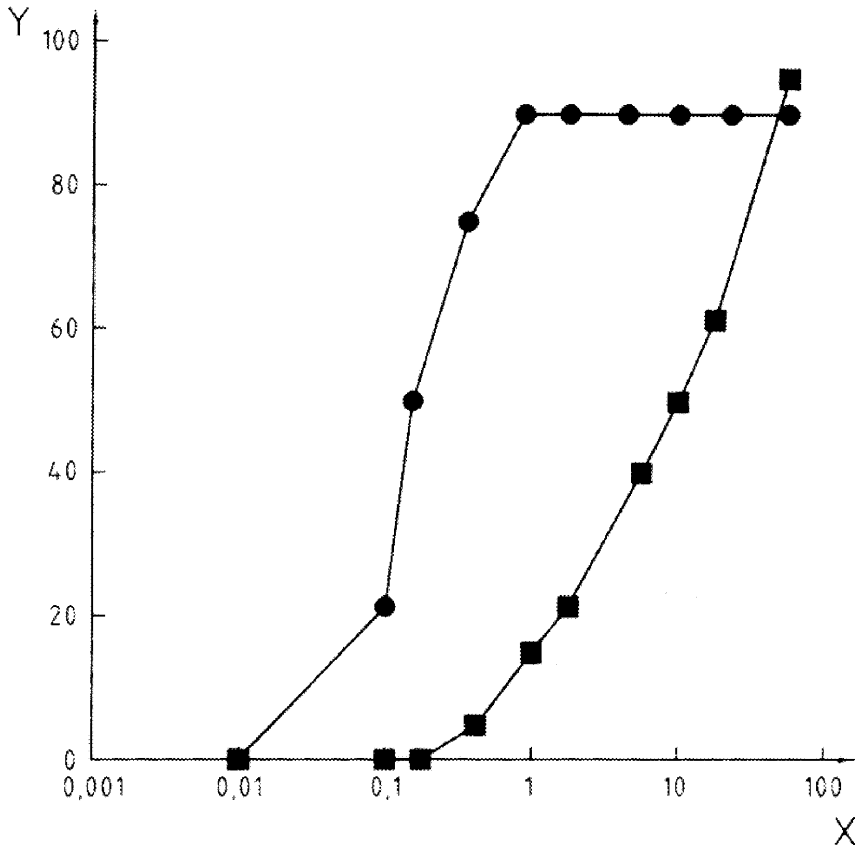
2 kisikova elektroda

3 instrument za mjerenje kisika

▼**M6**

Dodatak 4.

Slika 3. **Primjer krivulja inhibicije**



Legenda

X koncentracija 3,5-diklofenola (mg/l)

Y inhibicija (%)

■ inhibicija heterotrofnog disanja kod nitrificirajućeg mulja

● inhibicija nitrifikacije kod nitrificirajućeg mulja.

▼B

C.12. **BIORAZGRADNJA**

IZMIJENJENI TEST SCAS

1. **METODA**

1.1. UVOD

Svrha metode je ocijeniti potencijalnu potpunu biorazgradivost vodotopljivih nehlapljivih organskih tvari kod izlaganja relativno visokim koncentracijama mikroorganizama tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Mikroorganizmi se u tom razdoblju održavaju na životu svakodnevnim dodavanjem istaložene otpadne vode kao hranjive otopine. (Preko vikenda se otpadna voda može čuvati na 4 °C. Kao druga mogućnost, može se koristiti sintetička otpadna voda iz potvrdnog testa OECD.)

Kod tumačenja rezultata treba uzeti u obzir moguću fizikalno-kemijsku adsorpciju na suspendiranu krutu tvar (vidjeti 3.2.).

Zbog dugog vremena zadržavanja tekuće faze (36 sati) i periodičnog dodavanja nutrijenata ispitivanje ne oponaša uvjete koji vladaju u postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda. Rezultati dobiveni s različitim ispitivanim tvarima ukazuju na to da test ima visok potencijal biorazgradnje.

Uvjeti ispitivanja su izrazito povoljni za selekciju i/ili prilagodbu mikroorganizama koji imaju sposobnost razgradnje ispitivanog spoja. (Postupak se može koristiti i za dobivanje aklimatiziranih inokuluma za druga ispitivanja.)

U ovoj se metodi mjera koncentracije otopljenog organskog ugljika koristi za ocjenjivanje potpune biorazgradivosti ispitivane tvari. DOC je najbolje odrediti nakon zakiseljavanja i pročišćavanja, a ne kao razliku $C_{ukupni} - C_{anorganski}$.

Istovremenom primjenom specifične analitičke metode moguće je ocijeniti i primarnu biorazgradnju tvari (nestajanje polazne kemijske strukture).

Metoda se primjenjuje samo na one organske ispitivane tvari koje su u koncentraciji koja se koristi u ispitivanju:

— topljive u vodi (najmanje 20 mg otopljenog organskog ugljika/l),

— imaju zanemariv tlak pare,

— nemaju inhibitorni učinak na bakterije,

— ne adsorbiraju se u značajnoj mjeri unutar ispitnog sustava,

— ne gube se iz ispitne otopine pjenjenjem.

Mora biti poznat sadržaj organskog ugljika ispitivanog materijala.

▼B

Kod tumačenja dobivenih rezultata korisno je imati informacije o relativnim udjelima glavnih komponenti ispitivanog materijala, posebno ako su dobivene vrijednosti niske ili granične.

Informacije o toksičnosti tvari za mikroorganizme korisne su za tumačenje niskih vrijednosti i odabir odgovarajuće ispitne koncentracije.

1.2. DEFINICIJE I JEDINICE

C_T = koncentracija ispitivanog spoja kao organski ugljik koji je prisutan u istaloženoj otpadnoj vodi ili dodan na početku razdoblja dozračivanja (mg/l),

C_t = koncentracija otopljenog organskog ugljika u supernatantu ispitne jedinice na kraju razdoblja dozračivanja (mg/l),

C_c = koncentracija otopljenog organskog ugljika u supernatantu kontrolne jedinice na kraju razdoblja dozračivanja (mg/l).

U ovoj se metodi biorazgradnja definira kao nestajanje organskog ugljika. Biorazgradnja se može izraziti kao:

1. Postotak opadanja (D_{da}) količine tvari koja se dnevno dodaje:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

gdje je:

D_{da} = razgradnja/dnevno dodavanje.

2. Postotak opadanja (D_{ssd}) količine tvari koja je prisutna na početku svakog dana:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

gdje je

D_{ssd} = razgradnja/tvar na početku dana

Indeksi i i (i + 1) odnose se na dan mjerenja.

Jednadžba 2(a) preporučuje se ako se DOC izlazne otpadne vode mijenja iz dana u dan, dok se jednadžba 2(b) može koristiti kad DOC izlazne otpadne vode iz dana u dan ostaje relativno stalan.

▼B

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari mogu biti korisne kod ispitivanja novih tvari; ipak, ovdje se ne preporučuje određena referentna tvar.

Navedeni su podaci za nekoliko spojeva koji su ocijenjeni u prstenastim testovima (vidjeti Dodatak 1.); oni su prvenstveno predviđeni za povremeno baždarenje metode te za usporedbu rezultata kod primjene neke druge metode.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Aktivni mulj iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda stavi se u jedinicu aktivnog mulja s polukontinuiranim režimom (Semi-Continuous Activated Sludge unit, SCAS). Doda se ispitivani spoj i istaložena komunalna otpadna voda i smjesa dozračuje 23 sata. Dozračivanje se zatim prekida, pusti se da se mulj istaloži i ukloni supernatant.

Mulj koji preostane u komori za dozračivanje se zatim pomiješa s još jednim alikvotom ispitivanog spoja i otpadnom vodom i ciklus ponovi.

Biorazgradnja se utvrđuje određivanjem sadržaja otopljenog organskog ugljika u supernatantu. Ova se vrijednost uspoređuje s vrijednošću supernatanta iz kontrolne epruvete koja sadrži samo istaloženu otpadnu vodu.

U slučaju primjene specifične analitičke metode mogu se izmjeriti promjene koncentracije polazne molekule uslijed biorazgradnje (primarna biorazgradivost).

1.5. KRITERIJI KAKVOĆE

Obnovljivost ove metode, koja se temelji na opadanju otopljenog organskog ugljika, još nije utvrđena. (Ako se uzme u obzir primarna biorazgradnja, dobivaju se vrlo precizni podaci za tvari koje se opsežno razgrađuju.)

Osjetljivost metode u velikoj je mjeri ovisna o varijabilnosti slijepe probe te, u manjoj mjeri, o preciznosti određivanja otopljenog organskog ugljika i koncentraciji ispitivanog spoja u suspenziji na početku svakog ciklusa.

1.6. OPIS ISPITNOG POSTUPKA

1.6.1. *Priprema*

Uzme se dovoljan broj čistih jedinica za dozračivanje (može se koristiti i izvorna ispitna jedinica SCAS od 1,5 litara) i postave cijevi za dovod zraka (Slika 1.) za svaku ispitivanu tvar i kontrole. Komprimirani zrak koji se dovodi u ispitne jedinice pročišćava se kroz pamučni filtar; on ne smije sadržavati organski ugljik i treba ga prethodno zasititi vodom kako bi se smanjili gubici uslijed isparavanja.

Uzorak miješane suspenzije, koja sadrži od 1 do 4 g suspendirane krute tvari po litri, dobiva se iz postrojenja s aktivnim muljem u kojemu se pretežito pročišćava komunalna otpadna voda. Potrebno je približno 150 ml suspenzije po jedinici za dozračivanje.

▼B

Pripreme se radne otopine ispitivane tvari u destiliranoj vodi; u pravilu je potrebna koncentracija od 400 mg organskog ugljika po litri, čime se dobiva koncentracija ispitivanog spoja od 20 mg ugljika po litri na početku svakog ciklusa dozračivanja, ako ne dolazi do biorazgradnje.

Ako to dopušta toksičnost za mikroorganizme, dozvoljene su i više koncentracije.

Izmjeri se sadržaj organskog ugljika radnih otopina.

1.6.2. *Ispitni uvjeti*

Ispitivanje se provodi na 20 do 25 °C.

Koristi se visoka koncentracija aerobnih mikroorganizama (od 1 do 4 g/l suspendirane krute tvari), a efektivno razdoblje zadržavanja iznosi 36 sati. Ugljični materijal u otpadnoj vodi koja se koristi kao hranjivi medij se obilato oksidira, u pravilu tijekom osam sati nakon početka svakog ciklusa dozračivanja. Nakon toga mulj endogeno diše do kraja razdoblja dozračivanja, u kom je vremenu ispitivana tvar jedini raspoloživi supstrat, ako se i ona sama brzo ne razgradi. Ove značajke, uz svakodnevno ponovno inokuliranje kada se kao hranjivi medij koristi komunalna otpadna voda, osiguravaju izrazito povoljne uvjete za aklimatizaciju i visok stupanj biorazgradnje.

1.6.3. *Provođenje ispitivanja*

Iz prikladnog postrojenja s aktivnim muljem koje pretežito pročišćava komunalne otpadne vode ili laboratorijske jedinice uzme se uzorak miješane suspenzije i održava aerobnim do uporabe u laboratoriju. Sve jedinice za dozračivanje i kontrolna jedinica napune se sa 150 ml miješane suspenzije (ako se koristi izvorna ispitna jedinica SCAS ove količine treba pomnožiti s 10) i započne s dozračivanjem. Nakon 23 sata dozračivanje se prekida i pusti da se mulj istaloži u vremenu od 45 minuta. Zatim se otvori slavina i iz svake posude ispusti po 100 ml supernatanta. Uzme se svježi uzorak istaložene komunalne otpadne vode neposredno prije uporabe i 100 ml doda u preostali mulj svake jedinice za dozračivanje. Zatim se ponovno započne s dozračivanjem. U ovoj se fazi ne dodaje ispitivani materijal i jedinice se svakodnevno pune isključivo komunalnom otpadnom vodom dok se nakon taloženja ne dobije bistri supernatant. Za ovo su obično potrebna dva tjedna, do kada se otopljeni organski ugljik u supernatantu na kraju svakog ciklusa dozračivanja približi stalnoj vrijednosti.

Na kraju tog razdoblja se pojedinačni istaloženi muljevi pomiješaju i u svaku jedinicu doda 50 ml dobivenog složenog mulja.

U kontrolne se jedinice doda 95 ml istaložene otpadne vode i 5 ml vode, a u ispitne jedinice 95 ml istaložene otpadne vode i 5 ml odgovarajuće radne otopine ispitivanog spoja (400 mg/l). Ponovno se započne s dozračivanjem i dozračuje 23 sata. Zatim se pusti da se mulj istaloži 45 minuta, nakon čega se ispusti supernatant i analizira na sadržaj otopljenog organskog ugljika.

Gornji postupak punjenja i pražnjenja ponavlja se svakodnevno za vrijeme cjelokupnog trajanja ispitivanja.

▼B

Prije taloženja se prema potrebi očiste stijenke jedinica kako bi se spriječilo nakupljanje krute tvari iznad razine tekućine. Kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije, za svaku jedinicu treba koristiti zasebni strugač ili četkicu.

U idealnom se slučaju otopljeni organski ugljik u supernatantu određuje svakodnevno, ali dopuštene su i manje učestale analize. Suspenzije se prije analize filtriraju kroz oprane membranske filtre 0,45 μm ili centrifugiraju. Membranski filtri su prikladni pod uvjetom da ne otpuštaju ugljik i ne apsorbiraju tvar tijekom filtracije. Temperatura uzorka u centrifugi ne smije biti viša od 40 °C.

Trajanje ispitivanja kod spojeva koji se slabo biološki razgrađuju ili se ne razgrađuju nije određeno, ali iskustvo pokazuje da bi ispitivanje općenito trebalo trajati najmanje 12 tjedana, ali ne duže od 26 tjedana.

2. **PODACI I OCJENJIVANJE**

Izradi se grafički prikaz vrijednosti otopljenog organskog ugljika u supernatantu ispitnih i kontrolnih jedinica u ovisnosti vremenu.

Kad se ostvari biorazgradnja, vrijednosti ispitnih jedinica približit će se kontrolnim vrijednostima. Kad razlika između ispitnih i kontrolnih vrijednosti ostane na stalnoj razini u tri uzastopna mjerenja, provede se još toliko mjerenja koliko je potrebno za statističku obradu podataka i izračuna postotak biorazgradnje ispitivanog spoja (D_{da} ili D_{ssd}, vidjeti 1.2.).

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju po mogućnosti sadrži sljedeće:

— sve informacije o vrsti otpadne vode, vrsti jedinica koje se koriste i rezultatima pokusa za ispitivanu tvar, referentnu tvar (ako se koristi) i slijepu probu,

— temperaturu,

— krivulju opadanja s opisom, način izračuna (vidjeti 1.2.),

— datum i mjesto uzorkovanja aktivnog mulja i otpadne vode, stanje prilagodbe, koncentraciju itd.,

— znanstvene razloge mogućih izmjena ispitnog postupka,

— potpis i datum.

▼B

3.2. TUMAČENJE REZULTATA

Budući da tvari koje se ispituju ovom metodom nisu lako biorazgradive, svako opadanje DOC-a koje se isključivo može pripisati biorazgradnji u pravilu će se odvijati postupno tijekom više dana ili tjedana, osim ako aklimatizacija nastupi iznenada, što se očituje naglim nestankom DOC-a nakon nekoliko tjedana.

Međutim, ponekad važnu ulogu može imati i fizikalno-kemijska adsorpcija, na što ukazuje potpuno ili djelomično nestajanje dodanog DOC-a na samom početku. Daljnji slijed ovisi o čimbenicima kao što su stupanj adsorpcije i koncentracija suspendirane krute tvari u izvađenoj suspenziji. Razlika između koncentracije DOC-a u kontrolnom i ispitnom supernatantu obično se nakon niske početne vrijednosti postupno povećava i zatim ostaje na stalnoj razini do kraja pokusa, osim ako nastupi aklimatizacija.

Ako je potrebno razlikovati biorazgradnju (ili djelomičnu biorazgradnju) od adsorpcije, treba provesti dodatna ispitivanja. To se može učiniti na više načina, ali najpouzdaniji način je provesti ispitivanje osnovne razine koristeći supernatant ili mulj kao inokulum (po mogućnosti respirometrijski test).

Ispitivane tvari koje u ovom testu pokazuju značajno opadanje DOC-a koje nije uvjetovano adsorpcijom mogu se smatrati potencijalno biorazgradivima. Djelomično neadsorptivno opadanje ukazuje na to da je kemikalija barem donekle podložna biorazgradnji.

Malo opadanje ili nepromijenjena razina DOC-a može biti posljedica inhibitornog učinka ispitivane tvari na mikroorganizme, što se također može očitovati razlaganjem i gubitkom mulja i zamućenjem supernatanta. Ispitivanje treba ponoviti s nižom koncentracijom ispitivane tvari.

Primjenom specifične analitičke metode ili ^{14}C obilježene ispitivane tvari može se povećati osjetljivost. U slučaju ^{14}C obilježenog spoja, pojava biorazgradnje može se potvrditi izdvajanjem $^{14}CO_2$.

Ako se rezultati navode i kao primarna biorazgradnja, treba po mogućnosti objasniti promjenu kemijske strukture zbog koje izostaje odgovor polazne ispitivane tvari.

Potrebno je navesti validaciju analitičke metode zajedno s odgovorom medija slijepe probe.

4. **REFERENCE**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

Dodatak 1.

Test SCAS: primjer rezultata

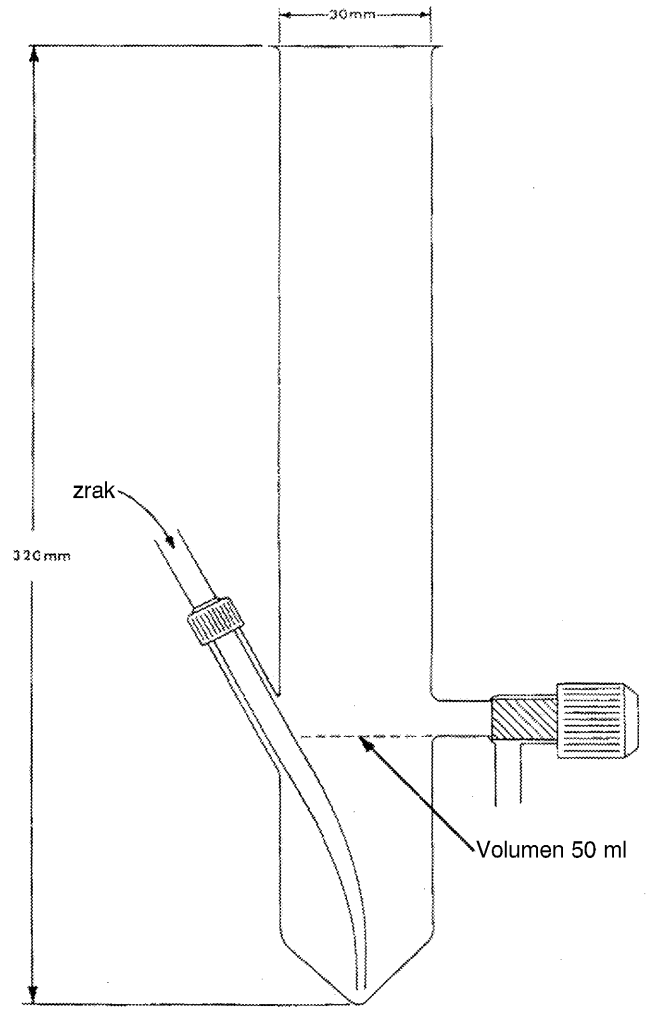
Tvar	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Postotak biorazgradnje D_{da}	Trajanje ispitivanja (dani)
4-acetil aminobenzen sulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilen benzen sulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glikol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentan tetrakarboksilat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Dodatak 2.

Primjer ispitne aparature

Slika 1.



▼M7

C.13. **BIOAKUMULACIJA U RIBAMA: VODENO IZLAGANJE ILI IZLAGANJE KROZ HRANU**

UVOD

Ova ispitna metoda (IM) odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 305 (2012.). Ova revizija ispitne metode ima dva ključna cilja. Kao prvo, namjerava se uključiti ispitivanje bioakumulacije kroz hranu ([1]) radi otkrivanja potencijala bioakumulacije tvari vrlo niske topljivosti u vodi. Kao drugo, namjerava se osmisliti ispitnu metodu pri kojoj se, prema potrebi, upotrebljava manje riba radi dobrobiti životinja i veće isplativosti.

U godinama nakon donošenja konsolidirane ispitne metode C.13. (1.) ispitane su brojne tvari te su laboratoriji i regulatorna tijela stekli znatno iskustvo. To je dovelo do uvjerenja da je moguće smanjiti složenost ispitivanja ako su ispunjeni određeni kriteriji (vidjeti stavak 88.) i da je moguć slojevit pristup. Iz iskustva je vidljivo i da biološki čimbenici poput rasta i sadržaja lipida u ribi mogu u velikoj mjeri utjecati na rezultate i možda ih treba uzeti u obzir. Nadalje, prihvaćena je činjenica da ispitivanje tvari vrlo niske topljivosti u vodi možda nije tehnički izvedivo. Usto, kod tvari vrlo niske topljivosti u vodnom okruženju vodeno izlaganje može biti manje važno u usporedbi s izlaganjem kroz hranu. To je dovelo do razvoja ispitne metode u kojoj se upotrebljava izlaganje riba putem hrane (vidjeti stavke od 7. do 14. i 97. nadalje). Validacija (međulaboratorijski (*ring*) test) ispitivanja izlaganjem kroz hranu provedena je 2010. (51.).

Neke su od glavnih promjena sljedeće:

— može se smatrati dovoljnim ispitivanje samo jedne ispitne koncentracije kad je vjerojatno da faktor biokoncentracije (BCF) ne ovisi o ispitnoj koncentraciji,

— ispitivanje smanjenim vodenim izlaganjem u kojem je moguća smanjena količina točki uzorkovanja ako su ispunjeni određeni kriteriji,

— sadržaj lipida u ribi trebalo bi mjeriti tako da se BCF može izraziti na temelju sadržaja lipida od 5 %,

— veći naglasak na procjeni kinetičkog BCF-a (kad je to moguće) u usporedbi s procjenom faktora bioakumulacije u stabilnom stanju,

— za određene će se skupine tvari predložiti ispitivanje izlaganjem kroz hranu ako ga se smatra primjerenijim od ispitivanja vodenim izlaganjem,

— masa ribe trebala bi se mjeriti tako da je moguće ispraviti BCF_k u odnosu na razrjeđenje zbog rasta ribe.

Prije ispitivanja bioakumulacije moraju biti poznate sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) osjetljivost analitičke tehnike za mjerenje koncentracija u tkivu te koncentracija u vodi ili hrani za ispitivanu tvar i moguće metabolite (vidjeti stavak 65.);

(b) topljivost u vodi [ispitna metoda A.6.; (2)]; trebalo bi je utvrditi u skladu s metodom koja je primjerena za (procijenjeni) raspon topljivosti kako bi se dobila pouzdana vrijednost. Za hidrofobne tvari to će uglavnom biti metoda eluiranja kolone;

([1]) Definicije i jedinice navedene su u Dodatku 1.

▼M7

(c) podjelni koeficijent n-oktanol-voda, K_{OW} ([1]) [ispitne metode A.8. (4.), A.24. (5.), A.23. (6.)]; ili druge primjerene informacije o ponašanju pri podjeli (npr. sorpcija u lipide, K_{OC}); to bi trebalo utvrditi u skladu s metodom koja je primjerena za (procijenjeni) raspon K_{OW} kako bi se dobila pouzdana vrijednost. Za hidrofobne tvari to će uglavnom biti metoda sporog miješanja [ispitna metoda A.23. (6.)];

(d) stabilnost tvari u vodi (hidroliza [ispitna metoda C.7. (7.)]);

(e) stabilnost tvari u hrani (posebno ako je odabrano ispitivanje izlaganjem kroz hranu);

(f) informacije o fototransformaciji relevantne za uvjete ozračivanja u ispitivanju (8.);

(g) površinska napetost (tj. za tvari kod kojih nije moguće utvrditi vrijednost log K_{OW}) [ispitna metoda A.5. (9.)];

(h) tlak pare [ispitna metoda A.4. (10.)];

(i) sve informacije o biotičkoj ili abiotičkoj razgradnji u vodi poput (ali ne isključivo) lake biorazgradivosti [ispitne metode C.4. dijelovi od II. do VII. (11.), C.29. (12.)], prema potrebi;

(j) informacije o metabolitima: struktura, vrijednost log K_{OW}, formacija i razgradivost, prema potrebi;

(k) konstanta disocijacije kiseline (pK_a) za tvari koje mogu ionizirati. pH-vrijednost ispitne vode trebalo bi prema potrebi prilagoditi kako bi se osiguralo da je tvar u neioniziranom obliku u ispitivanju ako odgovara vrsti riba.

Neovisno o odabranoj metodi izlaganja ili programu uzorkovanja, ova se ispitna metoda odnosi na postupak određivanja potencijala bioakumulacije tvari u ribama. Iako se prednost daje režimima protočnog ispitivanja, dopušteni su i polustatički režimi, uz uvjet da su ispunjeni kriteriji valjanosti (vidjeti stavke 24. i 113.). Kod načina izlaganja kroz hranu sustav protočnog ispitivanja nije potreban za održavanje koncentracija ispitivane tvari u vodi, ali pomoći će pri održavanju prikladnih koncentracija otopljenog kisika i osiguranju čistoće vode te uklanjanju utjecaja, na primjer, proizvoda izlučivanja.

Neovisno o odabranoj ispitnoj metodi, u ovoj se ispitnoj metodi pružaju dostatne pojedinosti za provođenje ispitivanja, istovremeno omogućujući odgovarajuću slobodu za prilagodbu plana izvođenja pokusa uvjetima u određenim laboratorijima i različitim obilježjima ispitivanih tvari. Ispitivanje vodenim izlaganjem najbolje se primjenjuje na stabilne organske tvari čije su vrijednosti log K_{OW} između 1,5 i 6,0 (13.), ali može ga se primijeniti i na izrazito hidrofobne tvari (čija je vrijednost log K_{OW} viša od 6,0) ako se može dokazati stabilna i potpuno otopljena koncentracija ispitivane tvari u vodi. Ako nije moguće dokazati stabilnu koncentraciju ispitivane tvari u vodi, ispitivanje vodenim izlaganjem nije odgovarajuće te bi za ispitivanje tvari u ribama trebalo primijeniti pristup kroz hranu (iako tumačenje i upotreba rezultata ispitivanja kroz hranu može ovisiti o regulatornom okviru). Prethodne procjene faktora biokoncentracije (BCF, ponekad ga se označuje s K_B) za organske tvari čije vrijednosti log K_{OW} iznose do otprilike 9,0 moguće je dobiti upotrebom jednadžbe iz Bintein *et al.* (14.). Prethodna

([1]) Ponekad označena oznakom P_{OW}; utvrđuje se metodom protresanja tikvice u ispitnoj metodi A.8. (4.), metodom HPLC u ispitnoj metodi A.24. (5.) i metodom sporog miješanja u ispitnoj metodi A.23. (6.). Tehnika generatorskih kolona ponekad se upotrebljava za utvrđivanje vrijednosti log K_{OW}. Dostupan je ograničen broj studija u kojima je upotrijebljena ta tehnika, prije svega za klorirane bifenile i dibenzodioksine (npr. Li i Doucette, 1993.) (3.). Za tvari koje mogu ionizirati, vrijednost log K_{OW} trebala bi se odnositi na neionizirani oblik.

▼M7

procjena faktora biokoncentracije za takve izrazito hidrofobne tvari može biti viša od vrijednosti faktora biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}) koja se očekuje dobiti iz laboratorijskih pokusa, posebno kad se za prethodne procjene upotrebljava jednostavni linearni model. U parametre značajne za potencijal bioakumulacije uključeni su konstanta brzine apsorpcije (k_1), konstanta brzine gubitka uključujući konstantu brzine izlučivanja (k_2), faktor biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}), kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K) i faktor biomagnifikacije kroz hranu (BMF) ([1]).

Radioaktivno obilježene ispitivane tvari mogu olakšati analizu uzoraka vode, hrane i riba te se mogu upotrijebiti pri utvrđivanju potrebe za identifikacijom i kvantifikacijom metabolita. Ako se ukupni radioaktivni ostatci mjere zasebno (npr. izgaranjem ili otapanjem tkiva), vrijednost BCF ili BMF temelji se na ukupnoj polaznoj tvari, zadržanim metabolitima i asimiliranom ugljiku. Vrijednosti BCF ili BMF koje se temelje na ukupnim radioaktivnim ostatcima stoga ne moraju biti izravno usporedive s vrijednostima BCF ili BMF dobivenima posebnom analizom samo polazne tvari. Postupci odvajanja kao što su TLC, HPLC ili GC ([2]) mogu se primijeniti prije analize u radioaktivno obilježenim ispitivanjima radi utvrđivanja vrijednosti BCF ili BMF na temelju polazne tvari. Kad se primjenjuju tehnike odvajanja potrebno je identificirati i kvantificirati polaznu tvar i relevantne metabolite ([3]) (vidjeti stavak 65.) ako se vrijednost BCF ili BMF temelji na koncentraciji polazne tvari u ribama, a ne na ukupnim radioaktivno obilježenim ostatcima. Moguće je i kombinirati ispitivanja ribljeg metabolizma ili *in vivo* distribucije s ispitivanjem bioakumulacije analizom i identificiranjem ostataka u tkivima. Mogućnosti metabolizma moguće je predvidjeti s pomoću odgovarajućih alata (npr. OECD-ov alat QSAR (15.) i vlastiti QSAR programi).

Odluku o tome hoće li se i kako ispitivanje provesti vodenim izlaganjem ili izlaganjem kroz hranu trebalo bi temeljiti na čimbenicima iz stavka 3. razmotrenima zajedno s relevantnim regulatornim okvirom. Na primjer, za tvari čija je vrijednost log K_{OW} visoka, ali ipak pokazuju znatnu topljivost u vodi u odnosu na osjetljivost dostupnih analitičkih tehnika trebalo bi u prvom redu razmotriti ispitivanje vodenim izlaganjem. Međutim, moguće je da informacije u pogledu topljivosti u vodi tih hidrofobnih vrsta tvari nisu konačne pa je mogućnost pripremanja stabilnih, mjerljivih otopljenih vodenih koncentracija (stabilne emulzije nisu dopuštene) odgovarajućih za ispitivanje vodenim izlaganjem potrebno istražiti prije donošenja odluke o ispitnoj metodi koju će se upotrijebiti (16.). Nije moguće pružiti točne obvezujuće smjernice o metodi koju treba upotrijebiti na temelju graničnih kriterija topljivosti u vodi i podjelnog koeficijenta oktanol-voda jer drugi čimbenici (analitičke tehnike, razgradnja, adsorpcija itd.) mogu znatno utjecati na primjenjivost metode iz prethodno navedenih razloga. Međutim, vrijednost log K_{OW} iznad 5 i topljivost u vodi ispod ~ 0,01 – 0,1 mg/l označuju raspon tvari kod kojih ispitivanje vodenim izlaganjem može postati znatno otežano.

Trebalo bi razmotriti druge čimbenike koji mogu utjecati na odabir ispitivanja, uključujući potencijal tvari za adsorpciju u ispitne posude i opremu, njezinu stabilnost u vodenim otopinama u odnosu na njezinu stabilnost u hrani za ribe (17., 18.) itd.

Informacije o tim praktičnim aspektima možda se nalaze u drugim završenim ispitivanjima vodenim izlaganjem. Dodatne informacije o procjeni aspekata u pogledu provođenja ispitivanja bioakumulacije dostupne su u literaturi (npr. 19.).

Za tvari kod kojih topljivost ili održavanje vodenih koncentracija te analiza tih koncentracija ne predstavljaju ograničenja za provedbu metode vodenog izlaganja, toj se metodi daje prednost u pogledu utvrđivanja potencijala biokoncentracije tvari. U svakom slučaju treba potvrditi da se koncentracije pri vodenom

([1]) Definicije i jedinice navedene su u Dodatku 1.

([2]) TLC: tankoslojna kromatografija; HPLC: visokotlačna tekućinska kromatografija; GC: plinska kromatografija

([3]) U određenim bi regulatornim okvirima mogla biti moguća obveza analize metabolita ako su ispunjeni određeni uvjeti (vidjeti stavak 65.).

▼M7

izlaganju u ispitnom mediju koje će se primijeniti nalaze unutar raspona topljivosti u vodi. Mogu se upotrijebiti različite metode za održavanje stabilnih koncentracija otopljene ispitivane tvari, poput upotrebe matičnih otopina ili sustava za pasivno doziranje (npr. metoda eluiranja kolone), pod uvjetom da se može dokazati da je moguće održati stabilne koncentracije i da se ispitni mediji ne mijenjaju u odnosu na one preporučene u stavku 27.

Za izrazito hidrofobne tvari (log K_{OW} > 5 i topljivost ispod ~ 0,01 – 0,1 mg/l) ispitivanje vodenim izlaganjem može postati znatno otežano. Razlozi za ograničenja može biti činjenica da nije moguće održati koncentraciju u vodi na razini koja se smatra dovoljno stalnom (npr. zbog sorpcije u staklo spremnika u kojima se provodi izlaganje ili zato što ribe brzo konzumiraju ispitnu tvar) ili to da su koncentracije u vodi koje će se primijeniti toliko niske da su na istoj razini kao analitičko ograničenje kvantifikacije ili ispod te razine ([1]). Za te izrazito hidrofobne tvari preporučuje se ispitivanje izlaganjem kroz hranu, pod uvjetom da je ispitivanje u skladu s relevantnim regulatornim okvirom i potrebama u pogledu procjene rizika.

a površinski aktivne tvari trebalo bi razmotriti je li izvedivo ispitivanje biokoncentracije vodenim izlaganjem uzimajući u obzir svojstva tvari, a u suprotnome će vjerojatno biti primjerenije ispitivanje izlaganjem kroz hranu. Površinski su aktivne tvari agensi koji umanjuju površinsku napetost između dvaju fluida. Zbog svoje se amfifilne prirode (tj. činjenice da sadržavaju i hidrofilni i hidrofobni dio) skupljaju u zonama razdvajanja između vode i zraka, vode i hrane te uz staklene stijenke, što onemogućuje utvrđivanje njihove koncentracije u vodi.

Ispitivanjem kroz hranu može se zaobići neke od aspekata izlaganja kod složenih smjesa sa sastavnim dijelovima koji imaju različita ograničenja u pogledu topljivosti u vodi zbog toga što je usporediva razina izlaganja svih sastavnih dijelova smjese vjerojatnija nego kod metode vodenog izlaganja (vidjeti 20.).

Treba napomenuti da se pristupom izlaganja kroz hranu dobiva faktor biomagnifikacije kroz hranu (BMF), a ne faktor biokoncentracije (BCF)) ([2]). Postoje pristupi kojima je moguće procijeniti kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K) iz podataka dobivenih iz ispitivanja kroz hranu (kako je navedeno u Dodatku 8.), ali te bi pristupe trebalo upotrebljavati uz oprez. Općenito, u tim se pristupima primjenjuje kinetika prvog reda te su primjenjivi samo na određene skupine spojeva. Takvi se pristupi vjerojatno ne mogu primjenjivati na površinski aktivne tvari (vidjeti stavak 12.).

Smanjeni plan ispitivanja vodenim izlaganjem s manje točaka uzorkovanja radi smanjenja broja životinja i/ili sredstava (vidjeti stavak 83. i dalje) trebalo bi primjenjivati samo na one tvari kod kojih nema razloga očekivati da će se apsorpcija i izlučivanje odvijati približno prema kinetici prvog reda (odnosno kod općenitih neioniziranih organskih tvari, vidjeti stavak 88.).

C.13 – I. **ISPITIVANJE BIOKONCENTRACIJE VODENIM IZLAGANJEM RIBA**

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivanjem su obuhvaćene dvije faze: faza izlaganja (apsorpcija) i faza nakon izlaganja (izlučivanje). Tijekom faze apsorpcije skupinu riba jedne vrste izlaže se ispitivanoj tvari u jednoj odabranoj koncentraciji ili više njih, ovisno o svojstvima ispitivane tvari (vidjeti stavak 49.). Zatim ih se prenosi u medij bez ispitivane tvari na fazu izlučivanja. Faza izlučivanja uvijek je potrebna, osim

([1]) Općenito bi izmjerene koncentracije u vodi tijekom faze apsorpcije trebale biti barem za jedan red veličine iznad ograničenja kvantifikacije kako bi se u fazi izlučivanja u okviru ispitivanja moglo izmjeriti više od jednog poluvijeka tjelesnog opterećenja.

([2]) Definicije i jedinice navedene su u Dodatku 1.

▼M7

ako je apsorpcija tvari tijekom faze apsorpcije bila neznatna. Koncentracija ispitivane tvari u/na ribi (odnosno njezinu određenom tkivu) prati se tijekom obiju faza ispitivanja. Uz izloženu skupinu, u ispitivanje je uključena i kontrolna skupina riba, koje se drži u istovjetnim uvjetima, ali bez prisutnosti ispitivane tvari, kako bi se mogući štetni učinci uočeni kod ispitivanja biokoncentracije mogli usporediti s odgovarajućom kontrolnom skupinom te da bi se dobile pozadinske koncentracije u ispitivanoj tvari ([1]).

U ispitivanju vodenim izlaganjem faza apsorpcije uobičajeno traje 28 dana. Trajanje se može produljiti prema potrebi (vidjeti stavak 18.) ili skratiti ako se dokaže da je stabilno stanje postignuto ranije (vidjeti Dodatak 1. o definicijama i jedinicama.) Trajanje faze apsorpcije i vrijeme potrebno da se postigne stabilno stanje može se predvidjeti uz pomoć jednadžbi iz Dodatka 5. Tada počinje razdoblje izlučivanja kad se ribe više ne izlaže ispitivanoj tvari te ih se prenosi u čistu posudu, u isti medij, ali bez ispitivane tvari. Ako je to moguće, poželjno je da se faktor biokoncentracije izračunava i kao omjer koncentracije u ribi (C_f) i u vodi (C_w) u stabilnom stanju (BCF_{SS}; vidjeti Dodatak 1., definicije) i kao kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K; vidjeti Dodatak 1., definicije i jedinice), koji se procjenjuje kao omjer konstanti brzine apsorpcije (k_1) i izlučivanja (k_2) uz pretpostavku kinetike prvog reda ([2]).

Ako se stabilno stanje ne postigne u roku od 28 dana, BCF se izračunava primjenom kinetičkog pristupa (vidjeti stavak 38.) ili se produljuje faza apsorpcije. Ako to uzrokuje pretjerano dugu fazu apsorpcije radi postizanja stabilnog stanja (vidjeti stavke 37. i 38. Dodatka 5.) prednost se daje kinetičkom pristupu. Kao drugu mogućnost za izrazito hidrofobne tvari treba razmotriti provođenje ispitivanja kroz hranu ([3]), pod uvjetom da je ono u skladu s relevantnim regulatornim okvirom.

Konstanta brzine apsorpcije, konstanta brzine izlučivanja (gubitka) (odnosno konstante, ako se koriste složeniji modeli), faktor biokoncentracije (u stabilnom stanju i/ili kinetički) te, po mogućnosti, granice pouzdanosti svakog od tih parametara izračunavaju se uz pomoć modela koji najbolje opisuje izmjerene koncentracije ispitivane tvari u ribama i vodi (vidjeti Dodatak 5).

Povećanje mase riba tijekom ispitivanja za posljedicu će imati smanjenje koncentracije ispitivane tvari u ribama koje rastu (tzv. razrjeđenje zbog rasta) te će zbog toga kinetički BCF biti podcijenjen ako ga se ne ispravi u odnosu na rast (vidjeti stavke 72. i 73.).

BCF se temelji na ukupnoj koncentraciji u ribi (tj. prema ukupnoj mokroj masi ribe). Ipak, za određene se potrebe mogu upotrijebiti određena tkiva ili organi (npr. mišići, jetra) ako je riba dovoljno velika odnosno ako je se može podijeliti u jestive (file) i nejestive (utroba) dijelove. Budući da kod mnogih organskih tvari postoji jasna veza između biokoncentracijskog potencijala i hidrofobnosti, isto tako postoji i odgovarajuća povezanost između sadržaja lipida ispitne ribe i

([1]) Kod većine ispitivanih tvari u idealnim uvjetima ne bi trebalo doći do detekcije u kontrolnoj vodi. Pozadinske koncentracije trebale bi biti relevantne samo za prirodno nastale materijale (npr. određene metale) i tvari koje su sveprisutne u okolišu.

([2]) Ako je očito da opaženo ne slijedi kinetiku prvog reda, treba primijeniti složenije metode (vidjeti literaturu u *Dodatku 5.*) i potražiti savjet biostatističara.

([3]) Apsorpcija može biti ograničena niskom koncentracijom izlaganja zbog niske topljivosti u vodi u ispitivanju biokoncentracije, dok je daleko više koncentracije pri izlaganju moguće postići ispitivanjem kroz hranu.

▼M7

zabilježene biokoncentracije tih tvari. Stoga bi radi smanjenja tog izvora varijabilnosti u rezultatima ispitivanja za te tvari visoke lipofilnosti (odnosno one čija je vrijednost log K_{OW} > 3) trebalo izražavati biokoncentraciju kao normiranu na ribe sa sadržajem lipida od 5 % (na temelju ukupne mokre mase ribe) uz onu dobivenu izravno iz ispitivanja. To je potrebno kako bi se dobila osnova na kojoj se rezultati za različite tvari i/ili ispitne vrste mogu uspoređivati jedni s drugima. Sadržaj lipida od 5 % upotrebljava se u velikoj mjeri jer predstavlja prosječni sadržaj lipida u ribama koje se uobičajeno upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi (21.).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Uz svojstva ispitivane tvari navedena u Uvodu (stavak 3.), potrebne su i informacije o njezinoj toksičnosti za riblje vrste koje će biti upotrijebljene u ispitivanju, po mogućnosti asimptotski LC_{50} (tj. neovisan o vremenu) i/ili toksičnost procijenjena dugoročnim ispitivanjima riba (npr. ispitne metode C.47. (22.), C.15. (23.), C.14. (24.)).

Trebala bi biti raspoloživa odgovarajuća analitička metoda poznate točnosti, preciznosti i osjetljivosti za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama i biološkom materijalu, zajedno s podacima o pripremi i skladištenju uzorka. Osim toga, trebaju biti poznate granice analitičke kvantifikacije ispitivane tvari u vodi i ribljim tkivima. Ako se upotrebljava radioaktivno obilježena ispitivana tvar, trebala bi biti najveće čistoće (npr. po mogućnosti > 98 %) te bi trebao biti poznat postotak radioktivnosti povezane s nečistoćama.

VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

odstupanja temperature vode iznose manje od ±2 °C jer veća odstupanja mogu utjecati na biološke parametre relevantne za apsorpciju i izlučivanje te uzrokovati stres životinjama;

koncentracija otopljenog kisika ne smije pasti ispod 60 % zasićenosti;

koncentracija ispitivane tvari u komorama održava se unutar ±20 % srednje vrijednosti izmjerene u fazi apsorpcije;

koncentracija je ispitivane tvari ispod svoje granice topljivosti u vodi, uzimajući u obzir učinak koji bi ispitna voda mogla imati na stvarnu topljivost ([1]);

smrtnost i drugi štetni učinci / bolest kod kontrolnih i obrađenih riba na kraju ispitivanja iznose ispod 10 %; ako ispitivanje traje više tjedana ili mjeseci, smrtnost i drugi štetni učinci u oba skupa riba trebaju biti ispod 5 % mjesečno i ukupno ne smiju prijeći 30 %. Znatne razlike u prosječnom rastu između ispitnih i kontrolnih skupina uzorkovanih riba mogu ukazivati na toksičan učinak ispitivane tvari.

REFERENTNE TVARI

Upotreba referentnih tvari poznatog potencijala biokoncentracije i slabijeg metaboliziranja bila bi korisna za provjeru postupka izvođenja pokusa, kad je to potrebno (npr. kad određeni laboratorij nema ranijih iskustava u tom ispitivanju ili su izmijenjeni uvjeti pokusa).

([1]) Kad je riječ o tvarima s više sastojaka, UVCB-ovima i smjesama, trebalo bi razmotriti topljivost u vodi svakog relevantnog sastojka radi utvrđivanja odgovarajućih koncentracija pri izlaganju.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

Treba voditi računa o tome da nijedan dio opreme ne sadržava materijale koji se mogu otapati, sorbirati ili ispirati i imati štetni učinak na ribe. Mogu se upotrebljavati standardni pravokutni ili cilindrični bazeni od kemijski inertnog materijala, prikladne zapremnine s obzirom na količinu punjenja (vidjeti stavak 43.). Uporabu mekanih plastičnih cijevi treba svesti na najmanju moguću mjeru. Trebalo bi upotrebljavati cijevi od politetrafluoroetilena, nehrđajućeg čelika i/ili stakla. Iz iskustva je poznato da je za ispitivane tvari s visokim koeficijentom adsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, ponekad potrebno upotrebljavati silanizirano staklo. U tom bi slučaju opremu trebalo baciti nakon upotrebe. Po mogućnosti bi prije uvođenja ispitnih organizama sustave za ispitivanje trebalo izložiti koncentracijama ispitivane tvari koja će biti upotrijebljena u ispitivanju toliko dugo koliko je potrebno da se dokaže održavanje stabilnih koncentracija pri izlaganju.

Voda

Pri ispitivanju se uglavnom upotrebljava prirodna voda dobivena iz neonečišćenog izvora ujednačene kvalitete. Međutim, obrađena bi voda (odnosno demineralizirana voda s određenim hranjivim tvarima koje su joj dodane u poznatim količinama) mogla biti prikladnija radi osiguravanja ujednačene razine kvalitete tijekom vremena. Kvaliteta vode za razrjeđivanje, odnosno voda koju se miješa s ispitivanom tvari prije unošenja u ispitnu posudu (vidjeti stavak 30.), trebala bi omogućivati preživljavanje odabranih ribljih vrsta tijekom razdoblja aklimatizacije i ispitivanja bez pojave neuobičajenog izgleda ili ponašanja. U idealnom slučaju treba dokazati da ispitna vrsta može preživjeti, rasti i razmnožavati se u vodi za razrjeđivanje (npr. u laboratorijskoj kulturi ili toksikološkom ispitivanju unutar životnog ciklusa). Vodu za razrjeđivanje treba opisati barem s obzirom na pH, tvrdoću, ukupni sadržaj krute tvari, ukupni organski ugljik (TOC ([1])) i, po mogućnosti, amonijak, nitrit i alkalitet te, kod morskih vrsta, salinitet. Parametri važni za optimalnu dobrobit riba nisu u cijelosti poznati, ali u Dodatku 2. navedene su preporučene maksimalne koncentracije za niz parametara za slatkovodnu i morsku ispitnu vodu.

Voda za razrjeđivanje treba biti stalne kvalitete dok traje ispitivanje. pH-vrijednost treba biti u rasponu od 6,0 do 8,5 na početku ispitivanja, pri čemu za vrijeme jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ±0,5 pH jedinica. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (na primjer stvaranjem kompleksa s ispitivanom tvari) ili imala negativan utjecaj na riblju populaciju, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu, a barem na početku i kraju ispitivanja. Utvrđivanje teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i SO_4^{2-}), pesticida (npr. ukupni organofosforni i ukupni organoklorni pesticidi), ukupnog organskog ugljika i suspendiranih krutih tvari treba provoditi, na primjer, svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Ako se dokaže da je kvaliteta vode za razrjeđivanje stalna tijekom najmanje jedne godine, ubuduće se kvaliteta može provjeravati rjeđe, a intervali mogu biti dulji (na primjer svakih šest mjeseci).

Sadržaj prirodnih čestica i ukupni organski ugljik u vodi za razrjeđivanje trebali bi biti što je moguće niži radi izbjegavanja adsorpscije ispitivane tvari u organsku tvar, zbog čega bi moglo doći do smanjenja njezine bioraspoloživosti te stoga do podcjenjivanja vrijednosti BCF-a. Maksimalna je prihvatljiva vrijednost 5 mg/l .za

([1]) TOC uključuje organski ugljik iz čestica i otopljenog organskog ugljika, odnosno TOC = POC + DOC.

▼M7

lebdeće čestice (suha tvar koja ne prolazi kroz filtar od 0,45 μm) i 2 mg/l za ukupni organski ugljik (vidjeti Dodatak 2.). Voda za razrjeđivanje se prema potrebi filtrira prije uporabe. Doprinos ispitnih riba (izlučevine) i ostataka hrane sadržaju organskog ugljika u ispitnoj vodi trebao bi biti što je moguće niži (vidjeti stavak 46.).

Ispitne otopine

Priprema se matična otopina koja sadržava prikladnu koncentraciju ispitivane tvari. Matičnu otopinu po mogućnosti se priprema miješanjem ili protresanjem ispitivane tvari u vodi za razrjeđivanje. U određenim slučajevima može biti primjereno upotrijebiti sustav doziranja za desorpciju krute faze. Upotreba otapala i dispergenata (otapajućih sredstava) uglavnom se ne preporučuje (vidjeti 25.); međutim, upotreba tih materijala može biti prihvatljiva radi proizvodnje matične otopine odgovarajuće koncentracije, ali trebalo bi poduzeti sve kako bi se upotreba tih materijala smanjila na minimum te ne bi trebalo prekoračiti njihovu kritičnu micelizacijsku koncentraciju (ako je relevantno). Otapala koja se mogu upotrebljavati su aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol; dispergenti koji su upotrijebljeni su Tween 80, metil-celuloza 0,01 % i HCO-40. Koncentracija otapala u konačnom ispitnom mediju trebala bi biti ista u svim grupama (odnosno ne ovisiti o koncentraciji ispitivane tvari) i ne bi smjela prelaziti odgovarajuće pragove toksičnosti koji su utvrđeni za otapalo u ispitnim uvjetima. Najviša koncentracija iznosi 100 mg/l (ili 0,1 ml/l). Nije vjerojatno da će koncentracija otapala od 100 mg/l znatno izmijeniti najvišu otopljenu koncentraciju ispitivane tvari koju je moguće postići u mediju (25.). Doprinos otapala (zajedno s ispitivanom tvari) ukupnom sadržaju organskog ugljika u ispitnoj vodi treba biti poznat. Za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja koncentracija ukupnog organskog ugljika u ispitnim posudama ne smije biti više od 10 mg/l (±20 %) veća od koncentracije organskog ugljika koji potječe od ispitivane tvari, kao i otapala ili otapajućeg sredstva ([1]) ako se upotrebljava. Sadržaj organskih tvari može u velikoj mjeri utjecati na količinu slobodno otopljene ispitivane tvari tijekom ispitivanja s ribama u protočnom postupku, posebno za izrazito lipofilne tvari. Iz mikroekstrakcije iz krute faze (vidjeti stavak 60.) moguće je dobiti važne informacije o omjeru između vezanih i slobodno otopljenih spojeva, pri čemu se za potonje smatra da predstavljaju bioraspoloživi dio. Koncentracija ispitivane tvari trebala bi biti ispod granice topljivosti ispitivane tvari u ispitnom mediju unatoč upotrebi otapala ili otapajućeg sredstva. Kod primjene lako biorazgradivih otapala potreban je poseban oprez jer oni u protočnim ispitivanjima mogu izazvati problem rasta bakterija. Ako nije moguće pripremiti matičnu otopinu bez upotrebe otapajućeg sredstva, trebalo bi razmotriti primjerenost ispitivanja vodenim izlaganjem u usporedbi s ispitivanjem izlaganjem kroz hranu.

Kad je riječ o protočnim ispitivanjima, za dopremanje ispitnih koncentracija u ispitne komore potreban je sustav koji stalno odmjerava i razrjeđuje matičnu otopinu ispitivane tvari (npr. dozirna crpka, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač) ili sustav doziranja za desorpciju krute tvari. Po mogućnosti bi kroz svaku ispitnu komoru svakodnevno trebalo proći barem pet izmjena volumena. Prednost treba dati protočnoj metodi, ali ako to nije moguće (npr. u slučaju štetnog učinka na ispitne organizme), može se upotrijebiti i polustatička tehnika, pod uvjetom da su zadovoljeni kriteriji valjanosti (vidjeti stavak 24.). Brzinu protoka matičnih otopina i vode za razrjeđivanje treba provjeriti 48 sati prije ispitivanja i zatim barem jedanput dnevno tijekom ispitivanja. Prilikom te provjere treba odrediti brzinu protoka kroz svaku ispitnu komoru i pobrinuti se za to da odstupanja unutar jedne komore i između komora ne budu veća od 20 %.

([1]) Iako se to uglavnom ne preporučuje, ako se upotrebljava otapalo ili otapajuće sredstvo, organski ugljik koji proizlazi iz tog sredstva trebalo bi dodati organskom ugljiku iz ispitivane tvari radi procjene koncentracije organskog ugljika u ispitnim posudama.

▼M7

Odabir vrste

Važni su kriteriji za odabir vrste laka dostupnost, raspoloživost u praktičnim veličinama i prikladnost za držanje u laboratorijskim uvjetima. U druge kriterije za odabir ribljih vrsta uključene su njihova važnost u rekreativnom, komercijalnom i ekološkom smislu kao i usporediva osjetljivost, prethodna uspješna upotreba itd. Preporučene ispitne vrste navedene su u Dodatku 3. Mogu se upotrebljavati i druge vrste, ali to može zahtijevati prilagodbu ispitnog postupka kako bi se osigurali prikladni ispitni uvjeti. U tom slučaju treba navesti razloge za odabir vrste i pokusnu metodu. U pravilu, upotreba ribljih vrsta manje veličine skratit će vrijeme potrebno za postizanje stabilnog stanja, ali možda će biti potrebno više riba (uzoraka) za odgovarajuću analizu sadržaja lipida i koncentracija ispitivane tvari u ribi. Nadalje, moguće je da će razlike u stopi disanja i metabolizmu između mlađih i starijih riba onemogućiti usporedbu rezultata između različitih ispitivanja i ispitnih vrsta. Treba napomenuti da kod ribljih vrsta koje se ispituje u životnoj fazi brzog rasta (mlade jedinke) može doći do komplikacija pri tumačenju podataka.

Držanje riba (koje se odnosi na vodeno izlaganje i izlaganje kroz hranu)

Matična populacija riba treba se aklimatizirati najmanje dva tjedna u vodi (vidjeti stavak 28.) pri ispitnoj temperaturi i cijelo vrijeme hraniti na odgovarajući način (vidjeti stavak 45.). Vrste vode i hrane trebale bi odgovarati onima koje će se upotrebljavati tijekom ispitivanja.

Nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati bilježi se smrtnost uz primjenu sljedećih kriterija:

— stopa smrtnosti viša od 10 % populacije u sedam dana: odbacuje se čitava serija;

— stopa smrtnosti između 5 i 10 % populacije u sedam dana: aklimatizacija od dodatnih sedam dana, a ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, čitava se serija odbacuje;

— stopa smrtnosti niža od 5 % populacije u sedam dana: serija se prihvaća.

Ribe koje se upotrebljavaju u ispitivanjima ne smiju imati vidljive znakove bolesti ni abnormalnosti. Odbacuju se sve bolesne ribe. Ribe se ne smiju liječiti dva tjedna prije ispitivanja niti za vrijeme ispitivanja.

PROVOĐENJE ISPITIVANJA

Preliminarno ispitivanje

Preliminarni pokus može biti koristan za optimizaciju uvjeta ispitivanja za glavno ispitivanje, primjerice odabir koncentracija ispitivane tvari, trajanje faza apsorpcije i izlučivanja, ili za utvrđivanje potrebe za provođenjem potpunog ispitivanja. Preliminarno ispitivanje trebalo bi biti isplanirano tako da se njime dobiju potrebne informacije. Može ga se razmotriti ako je za dobivanje BCF-a dovoljno skraćeno ispitivanje ili ako je potrebno potpuno ispitivanje (vidjeti stavke od 83. do 95. u pogledu skraćenog ispitivanja).

Uvjeti izlaganja

Trajanje faze apsorpcije

Predviđanje trajanja faze apsorpcije može se dobiti iz praktičnog iskustva (npr. iz ranijeg ispitivanja ili ispitivanja akumulacije na nekoj strukturno srodnoj tvari) ili iz određenih empirijskih odnosa primjenjujući saznanja o topljivosti u vodi ili podjelnom koeficijentu oktanol-voda ispitivane tvari (pod uvjetom da apsorpcija slijedi kinetiku prvog reda, vidjeti Dodatak 5.).

▼M7

Faza apsorpcije trebala bi trajati 28 dana, osim ako se može dokazati da je stabilno stanje postignuto ranije (vidjeti Dodatak 1., definicije i jedinice). Na grafičkom prikazu ispitivane tvari u ribi (C_f) u ovisnosti o vremenu smatra se da je stabilno stanje postignuto kad krivulja postane paralelna s vremenskom osi i kad se tri uzastopne analize C_f na uzorcima uzetima u razmacima od najmanje dva dana razlikuju za najviše ±20 % i kad nema znatnog povećanja vrijednosti C_f između prve i posljednje uzastopne analize. Kad se analiziraju objedinjeni uzorci potrebne su najmanje četiri uzastopne analize. Kod ispitivanih tvari koje se sporo apsorbiraju, prikladniji su razmaci od sedam dana. Ako stabilno stanje nije postignuto nakon 28 dana, BCF se izračunava primjenom samo kinetičkog pristupa, koji ne ovisi o postizanju stabilnog stanja, ili se produljuje faza apsorpcije, uz dodatna mjerenja, sve dok se ne postigne stabilno stanje ili na 60 dana, ovisno o tome koje je razdoblje kraće. Isto tako, koncentracija ispitivane tvari u ribi na završetku faze apsorpcije mora biti dovoljno visoka kako bi se osigurala pouzdana procjena vrijednosti k_2 iz faze izlučivanja. Ako nakon 28 dana nije zabilježena dostatna apsorpcija, ispitivanje se može prekinuti.

Trajanje faze izlučivanja

Za tvari koje slijede kinetiku prvog reda uobičajeno je dostatna polovina trajanja faze apsorpcije kako bi došlo do odgovarajućeg (npr. 95 %) smanjenja tjelesnog opterećenja koje nastaje zbog tvari (vidjeti Dodatak 5. za objašnjenje procjene). Ako je vrijeme potrebno da se postigne 95 % gubitka pretjerano dugo, primjerice ako je dvostruko duže od uobičajenog trajanja faze apsorpcije (tj. duže od 56 dana), može se primijeniti kraće razdoblje (npr. dok koncentracija ispitivane tvari ne padne ispod 10 % koncentracije u stabilnom stanju). Međutim, mogla bi biti potrebna dulja razdoblja izlučivanja za tvari sa složenijim obrascima apsorpcije i izlučivanja koji se ne mogu predstaviti modelom s jednim odjeljkom koji se primjenjuje na ribe i daje kinetiku prvog reda. Ako se ti složeniji obrasci uoče i/ili očekuju, preporučuje se potražiti savjet biostatističara i/ili farmakokinetičara radi osiguranja ispravnog plana ispitivanja. S produljenjem razdoblja izlučenja moglo bi doći do ograničenja broja riba za uzorkovanje, a razlike u veličini riba mogu utjecati na rezultate. Međutim, to će razdoblje biti uvjetovano i razdobljem tijekom kojeg se koncentracija ispitivane tvari u ribama zadržava iznad analitičke granice kvantifikacije.

Broj ispitnih riba

Odabire se broj riba po ispitnoj koncentraciji tako da na svakoj točki uzorkovanja budu raspoložive najmanje četiri ribe. Ribe je potrebno skupiti samo ako analiza pojedinačnih riba nije izvediva. Ako se planira preciznije prilagođavanje krivulje (i izvedenih parametara) ili ako su potrebna ispitivanja metabolizma (na primjer radi razlikovanja metabolita i polazne tvari pri upotrebi radioaktivno obilježenih ispitivanih tvari), bit će potrebno više riba po točki uzorkovanja. Sadržaj lipida treba odrediti na biološkom materijalu koji se upotrebljava za određivanje koncentracije ispitivane tvari. Ako to nije izvedivo, možda će biti potrebno više riba (vidjeti stavke 56. i 57.).

Ako se upotrebljavaju odrasle (tj. spolno zrele) jedinke riba, one ne bi trebale biti u stanju mrijesta ili nedavno mriještene (tj. već izmriještene) prije ispitivanja ili tijekom njega. Trebalo bi navesti i upotrebljavaju li se u pokusu muške ili ženske jedinke riba ili obje. Ako se upotrebljavaju oba spola, potrebno je dokumentirati da su razlike u rastu i sadržaju lipida između spolova prije početka izlaganja neznatne, posebno ako se očekuje da će biti potrebno skupljanje muških i ženskih jedinki riba kako bi koncentracije tvari i/ili sadržaj lipida bili dovoljno veliki za detekciju.

▼M7

Kod svih se ispitivanja odabiru ribe slične mase, tako da najmanja riba ne teži manje od dvije trećine mase najveće ribe. Sve ribe trebaju biti istoga godišta i istog podrijetla. Budući da masa i dob ribe mogu znatno utjecati na vrijednosti BCF-a (12.)., te bi pojedinosti trebalo ispravno zabilježiti. Preporučuje se vaganje poduzorka riblje populacije neposredno prije početka ispitivanja radi procjene prosječne mase (vidjeti stavak 61.).

Punjenje

Potrebno je upotrijebiti visoke omjere vode i riba kako bi se minimiziralo smanjenje koncentracije ispitivanog spoja u vodi koju uzrokuje dodavanje ribe na početku ispitivanja te kako bi se izbjegla smanjenja koncentracije otopljenog kisika. Važno je da gustoća punjenja bude prilagođena ispitnoj vrsti. U svakom se slučaju uobičajeno preporučuje gustoća punjenja od 0,1 – 1,0 g ribe (mokre mase) po litri vode po danu. Više gustoće punjenja ribe u odnosu na vodu mogu se upotrebljavati ako se dokaže da se tražena koncentracija ispitivane tvari može održavati u granicama ±20 % i da koncentracija otopljenog kisika ne pada ispod 60 % zasićenosti (vidjeti stavak 24.).

Kod odabira odgovarajućeg režima punjenja uzima se u obzir uobičajeno stanište riblje vrste. Na primjer, ribama koje žive na dnu uobičajeno je potrebno više prostora pri dnu akvarija kod istog volumena vode nego pelagijskim vrstama.

Hranjenje

Ribe se tijekom razdoblja aklimatizacije i ispitivanja hrani odgovarajućom hranom s poznatim sadržajem lipida i ukupnog sadržaja proteina u količini koja je dovoljna da ostanu zdrave i zadrže tjelesnu masu (dopušteno je da malo narastu). Hrani ih se svakodnevno tijekom razdoblja aklimatizacije i ispitivanja u količini određenoj ovisno o vrsti koja se upotrebljava, uvjetima pokusa i kalorijskoj vrijednosti hrane (na primjer, za kalifornijsku pastrvu između otprilike 1 do 2 % tjelesne mase dnevno). Brzinu hranjenja trebalo bi određivati tako da se izbjegavaju brz rast i veliko povećanje sadržaja lipida. Kako bi se održala ista brzina hranjenja, količinu hrane trebalo bi prema potrebi ponovno izračunavati, na primjer jedanput tjedno. Za potrebe tog izračuna masa riba u pojedinoj ispitnoj komori može se procijeniti iz mase posljednjeg ribljeg uzorka uzetog iz te komore. Ribe koje ostanu u komori ne važu se.

Nepojedenu hranu i izmet potrebno je svakodnevno ispustiti iz ispitnih komora ubrzo nakon hranjenja (30 minuta do jedan sat). Komore je tijekom ispitivanja potrebno održavati što čišćima kako bi se koncentraciju organske tvari održavalo što je moguće nižom (vidjeti stavak 29.) jer prisutnost organskog ugljika može ograničiti bioraspoloživost ispitivane tvari (12.).

Budući da se brojne vrste hrane dobivaju iz ribljeg brašna, trebalo bi osigurati da hrana ne utječe na rezultate ispitivanja i da ne izaziva štetne učinke, na primjer, zbog prisutnosti (u tragovima) pesticida, teških metala i/ili same ispitivane tvari.

Svjetlo i temperatura

Preporučuje se fotoperiod od 12 do 16 sati, a temperatura (± 2°C) bi trebala odgovarati ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 3.). Vrsta i značajke osvjetljenja trebaju biti poznati. Treba uzeti u obzir mogućnost fotokemijske pretvorbe ispitivanih tvari u uvjetima ozračivanja. Treba koristiti odgovarajuće osvjetljenje kako ribe ne bi bile izložene neprirodnim fotoproduktima. U nekim je slučajevima potrebno koristiti filtar koji ne propušta UV zračenje ispod 290 nm.

▼M7

Ispitne koncentracije

Ispitivanje je izvorno osmišljeno za nepolarne organske tvari. Za tu se vrstu tvari očekuje da će izlaganje ribe samo jednoj koncentraciji biti dovoljno jer se ne očekuju učinci koncentracije, iako bi mogle biti potrebne dvije koncentracije u skladu s relevantnim regulatornim okvirom. Ako se ispituju tvari izvan te domene ili su poznate druge indikacije u pogledu moguće ovisnosti o koncentraciji, ispitivanje bi trebalo provesti s još dvije koncentracije ili više njih. Ako se ispituje samo jedna koncentracija, to bi trebalo opravdati (vidjeti stavak 79.). Isto tako, ispitivana koncentracija trebala bi biti što je moguće niža u smislu praktičnih ili tehničkih mogućnosti (odnosno ne smije biti blizu granice topljivosti).

U određenim se slučajevima može očekivati da će biokoncentracija tvari ovisiti o koncentraciji u vodi (npr. za metale, kod kojih je moguće da će apsorpcija riba biti barem djelomično regulirana). U tim je slučajevima potrebno ispitati najmanje dvije koncentracije koje su relevantne za okoliš, a ako je moguće i više njih (vidjeti stavak 49.) Za tvari kod kojih ispitivane koncentracije moraju iz praktičnih razloga biti blizu granice topljivosti isto se tako preporučuje ispitivanje s najmanje dvije koncentracije jer se tako može dobiti uvid u pouzdanost koncentracija pri izlaganju. U odabir ispitnih koncentracija trebale bi biti uključene koncentracija koja se realistično može javiti u okolišu i koncentracija relevantna za potrebe određene procjene.

Koncentracije ispitivane tvari trebalo bi birati tako da budu ispod granice kroničnih učinaka ili ispod 1 % akutnog asimptotskog LC_{50}, unutar raspona koji je relevantan za okoliš i najmanje za jedan red veličine iznad granice kvantifikacije u vodi na temelju upotrijebljene analitičke metode. Najviša dopuštena ispitna koncentracija može se utvrditi i dijeljenjem akutnog 96 h LC_{50} s odgovarajućim akutnim/kroničnim omjerom (npr. odgovarajući su omjeri za neke tvari oko tri, ali za nekoliko njih iznad 100). Ako se upotrebljava druga koncentracija, trebala bi se razlikovati od one prethodno navedene za faktor deset. Ako to nije moguće zbog kriterija toksičnosti (koji ograničava gornju ispitnu koncentraciju) i analitičke granice (koja ograničava donju ispitnu koncentraciju), moguće je upotrijebiti faktor niži od deset i trebalo bi razmotriti upotrebu radioaktivno obilježene ispitivane tvari (najviše čistoće, po mogućnosti > 98 %). Trebalo bi voditi računa o tome da ni jedna upotrijebljena koncentracija ne bude iznad granice topljivosti ispitivane tvari u ispitnom mediju.

Kontrole

Uz ispitni bi niz trebalo bi provesti jednu kontrolu s vodom za razrjeđivanje ili prema potrebi (vidjeti stavke 30. i 31.) jednu kontrolu s otapalom.

Učestalost mjerenja kvalitete vode

Tijekom ispitivanja u svim je ispitnim i kontrolnim posudama potrebno mjeriti otopljeni kisik, TOC, pH i temperaturu. Ukupnu tvrdoću i salinitet (prema potrebi) trebalo bi mjeriti u kontrolnoj posudi (kontrolnim posudama) i jednoj od posuda. Ako se upotrebljavaju dvije koncentracije ili više njih, ti se parametri mjere pri višoj (ili najvišoj) koncentraciji. Otopljeni kisik i salinitet (prema potrebi) trebalo bi mjeriti najmanje tri puta, na početku, oko sredine i na kraju razdoblja apsorpcije te jedanput tjedno u razdoblju izlučivanja. TOC bi trebalo mjeriti na početku ispitivanja (24 sata i 48 sati prije početka faze apsorpcije) prije uvođenja riba i najmanje jedanput tjedno u fazi apsorpcije i izlučivanja. Temperaturu bi trebalo mjeriti i evidentirati svakodnevno, pH-vrijednost na početku i kraju svakog razdoblja, a tvrdoću jedanput tijekom ispitivanja. Temperaturu bi, po mogućnosti, trebalo neprekidno pratiti u najmanje jednoj posudi.

▼M7

Uzorkovanje i analiza riba i vode

Raspored uzorkovanja riba i vode

Uzorke vode iz ispitnih komora za određivanje koncentracije ispitivane tvari trebalo bi uzimati prije uvođenja riba te tijekom faze apsorpcije i izlučivanja. Vodu bi trebalo uzorkovati prije hranjenja, istovremeno s uzorkovanjem riba. Češćim bi se uzorkovanjem moglo osigurati stabilne koncentracije nakon uvođenja riba. Tijekom faze apsorpcije trebalo bi utvrditi koncentracije ispitivane tvari radi provjere usklađenosti s kriterijima valjanosti (stavak 24.). Činjenicu da su analize uzorka vode na početku faze izlučivanja pokazale da nije uočena ispitivana tvar moguće je iskoristiti kao opravdanje za neprovođenje mjerenja ispitne i kontrolne vode u pogledu ispitivane tvari tijekom preostalog dijela faze izlučivanja.

Ribe bi trebalo uzorkovati s obzirom na prisutnost ispitivane tvari u najmanje pet navrata tijekom faze apsorpcije i u najmanje četiri navrata tijekom faze izlučivanja. Budući da je u pojedinim slučajevima na temelju tog broja uzoraka teško napraviti dovoljno preciznu procjenu vrijednosti BCF-a (posebno ako ne vrijedi jednostavna kinetika apsorpcije i izlučivanja prvog reda), preporučuje se češće uzimanje uzoraka u oba razdoblja (vidjeti Dodatak 4.).

Sadržaj lipida trebalo bi utvrditi na istom biološkom materijalu koji se upotrebljava za utvrđivanje koncentracije ispitivane tvari barem na početku i kraju faze apsorpcije te na kraju faze izlučivanja. Ako to nije izvedivo, trebalo bi uzorkovati najmanje tri zasebne ribe kako bi se utvrdio sadržaj lipida u svakoj od triju istovjetnih vremenskih točaka. Broj riba po akvariju na početku pokusa trebalo bi prilagoditi na odgovarajući način ([1]). Druga je mogućnost, ako nisu uočene znatne količine ispitivane tvari kod kontrolnih riba (odnosno riba iz matične populacije), analizirati kontrolne ribe iz ispitivanja samo radi utvrđivanja sadržaja lipida, a analiza ispitivane tvari u ispitnoj skupini ili skupinama (kao i povezana konstanta brzine apsorpcije, konstanta brzine izlučivanja i vrijednosti BCF-a) može se ispraviti u odnosu na promjene u skladu sa sadržajem lipida kod kontrolne skupine tijekom ispitivanja ([2]).

Uginule ili bolesne ribe ne bi trebalo analizirati na koncentraciju ispitivane tvari ili lipida.

Primjer prihvatljivog rasporeda uzorkovanja prikazan je u Dodatku 4. Druge je rasporede lako izračunati upotrebom drugih pretpostavljenih vrijednosti K_{OW} radi izračuna vremena izlaganja za apsorpciju od 95 % (izračuni su dostupni u Dodatku 5.).

Uzorkovanje bi trebalo nastaviti tijekom faze apsorpcije dok se ne postigne stabilno stanje (vidjeti Dodatak 1., definicije i jedinice) ili, ako se ono ne postigne, prekida faze apsorpcije (nakon 28 ili 60 dana, vidjeti stavke 37. i 38.). Prije početka faze izlučivanja ribe je potrebno premjestiti u čiste posude.

Uzorkovanje i priprema uzoraka

Uzorke vode potrebno je uzeti za analizu, na primjer, isisavanjem kroz inertnu cijev iz središta ispitne komore. Čini se da se ni filtracijom ni centrifugiranjem ne uspijeva uvijek odvojiti dio ispitivane tvari koji nije bioraspoloživ od onog koji je bioraspoloživ. Ako se primjenjuje tehnika odvajanja, u izvješću o ispitivanju uvijek bi trebalo navesti opravdanje za tehniku odvajanja ili je validirati, uzimajući u obzir poteškoće u pogledu bioraspoloživosti (25.). Posebno u slučaju izrazito hidrofobnih tvari (odnosno onih tvari čija je vrijednost log K_{OW} > 5) (12., 26.), kod kojih bi moglo doći do adsorpcije u matricu filtra ili spremnike za

([1]) Ako se sadržaj lipida ne analizira kod istih riba kao i ispitivana tvar, ribe bi trebale biti barem iste mase i (prema potrebi) istog spola.

([2]) Ta je druga mogućnost moguća samo ako se ribe u svim ispitnim skupinama drži u sličnim veličinama skupine, uklanja ih se u skladu s istim obrascem i hrani na isti način. Time se osigurava da rast riba u svim ispitnim skupinama bude sličan ako je ispitna koncentracija ispod toksične razine. Ako je rast sličan, očekuje se da će i sadržaj lipida biti sličan. Različit rast u kontrolnoj skupini ukazivao bi na učinak tvari i učinio ispitivanje nevaljanim.

▼M7

centrifugiranje, uzorke ne bi trebalo podvrgnuti tim tretiranjima. Umjesto toga trebalo bi akvarije održavati što je moguće čišćima (vidjeti stavak 46.), a sadržaj ukupnog organskog ugljika trebalo bi pratiti tijekom faze apsorpcije i faze izlučivanja (vidjeti stavak 53.). Kako bi se izbjegli mogući problemi sa smanjenom bioraspoloživošću, moguće je upotrijebiti tehnike uzorkovanja mikroekstrakcijom iz krute faze u slučaju slabo topljivih tvari i izrazito hidrofobnih tvari.

Uzorkovane ribe trebalo bi eutanizirati bez odlaganja, primjenom najprimjerenije humane metode (kod mjerenja cijelih riba ne bi trebalo provoditi nikakve postupke osim ispiranja vodom (vidjeti stavak 28.) i sušenja upijajućim materijalom). Ribe se važe te se mjeri ukupna dužina ([1]). Kod svake pojedinačne ribe izmjerenu masu i dužinu trebalo bi povezati s koncentracijom analizirane tvari (i, prema potrebi, sadržajem lipida), na primjer upotrebom koda jedinstvenog identifikatora za svaku uzorkovanu ribu.

Ribe i vodu treba po mogućnosti analizirati odmah nakon uzorkovanja kako bi se spriječila razgradnja i drugi gubici te kako bi se još dok ispitivanje traje mogle izračunati približne konstante brzine apsorpcije i izlučivanja. Osim toga, ako se analiza provede odmah, izbjegava se kašnjenje u određivanju platoa (stabilnog stanja).

Ako se analiza ne obavi odmah, uzorke je potrebno uskladištiti primjerenom metodom. Prije početka ispitivanja potrebno je dobiti informacije o ispravnoj metodi skladištenja za određenu ispitivanu tvar, na primjer, duboko zamrzavanje, čuvanje pri temperaturi od 4 °C, ekstrakcija itd. Trajanje skladištenja određuje se tako da se osigura da se tvar ne razgradi tijekom skladištenja.

Kvaliteta analitičke metode

Budući da čitav postupak uglavnom ovisi o točnosti, preciznosti i osjetljivosti analitičke metode koja se primjenjuje u odnosu na ispitivanu tvar, potrebno je pokusima provjeriti jesu li točnost, preciznost i obnovljivost analize tvari te izdvajanje ispitivane tvari iz vode i ribe zadovoljavajući za određenu metodu. To bi trebao biti sastavni dio preliminarnih ispitivanja. Također je potrebno potvrditi da ispitivana tvar nije prisutna u vodi za razrjeđivanje koja se upotrebljava. Ako je potrebno, ispravljaju se vrijednosti koncentracije ispitivane tvari u vodi i ribi dobivene iz ispitivanja u odnosu na izdvojenu tvar i pozadinske vrijednosti kontrola. Pri rukovanju uzorcima riba i vode potrebno je stalno voditi računa o tome da se onečišćenje i gubici (npr. uslijed adsorpcije uređajem za uzorkovanje) svedu na najmanju moguću mjeru.

Analiza uzoraka riba

Ako se u ispitivanju upotrebljavaju radioaktivno obilježeni materijali, uzorke je moguće analizirati na ukupnu radioaktivnu oznaku (tj. polazna tvar i metaboliti) ili pročistiti tako da se polazni spoj može analizirati zasebno. Ako je vrijednost BCF-a potrebno temeljiti na polaznoj tvari, trebalo bi zabilježiti najvažnije metabolite, barem na kraju faze apsorpcije (vidjeti stavak 6.). Najvažniji su metaboliti oni koji čine ≥ 10 % ukupnih ostataka u tkivima riba, oni koji čine ≥ 5 % na dvije uzastopne točke uzorkovanja, oni kod kojih je uočeno povećanje razina tijekom faze apsorpcije i oni koji su toksikološki značajni. Ako BCF za cijelu ribu u smislu ukupnih radioaktivno obilježenih ostataka iznosi ≥ 500, savjetuje se, a u slučaju određenih kategorija tvari poput pesticida svesrdno preporučuje,

([1]) Uz masu trebalo bi evidentirati i ukupnu dužinu jer je usporedba mjere u kojoj je došlo do povećanja dužine tijekom ispitivanja dobar pokazatelj toga je li došlo do štetnog učinka.

▼M7

identificirati i kvantificirati najvažnije metabolite. Određena regulatorna tijela mogla bi zahtijevati kvantifikaciju tih metabolita. Ako se identificiraju i kvantificiraju proizvodi razgradnje koji čine ≥ 10 % ukupnih radioaktivno obilježenih ostataka u ribljim tkivima, preporučuje se da se ti proizvodi razgradnje identificiraju i kvantificiraju i u ispitnoj vodi. Ako to nije izvedivo, u izvješću je potrebno navesti objašnjenje.

Koncentraciju ispitivane tvari obično bi trebalo odrediti za svaku pojedinačnu izvaganu ribu. Ako to nije moguće, može se udružiti uzorke pri svakom uzorkovanju, ali udruživanjem se ograničavaju statistički postupci koje se može primijeniti na podatke pa je u ispitivanje potrebno uključiti odgovarajući broj riba za izvršavanje željenog udruživanja, statistički postupak i snagu. Kao uvod u relevantne postupke udruživanja može se pogledati literaturu (27. i 28.).

Vrijednost BCF-a trebalo bi izraziti kao normiranu za ribu sa sadržajem lipida od 5 % (na temelju mokre mase) uz onu dobivenu izravno iz ispitivanja (vidjeti stavak 21.), osim ako se može dokazati da se ispitivana tvar ne akumulira prvenstveno u lipidima. Sadržaj lipida u ribi trebalo bi, kad god postoje uvjeti za to, utvrđivati pri svakom uzorkovanju, po mogućnosti na istom ekstraktu kao onome koji je dobiven za analizu ispitivane tvari jer je lipide često potrebno ukloniti iz ekstrakta prije kromatografske analize. Međutim, za analizu ispitivanih tvari često su potrebni posebni postupci ekstrakcije koji mogu biti protivni ispitnim metodama za utvrđivanje lipida. U tom se slučaju (dok ne budu dostupne odgovarajuće nedestruktivne instrumentalne metode) preporučuje primjena drukčije strategije za utvrđivanje sadržaja lipida u ribi (vidjeti stavak 56.). Za utvrđivanje sadržaja lipida potrebno je upotrebljavati prikladne metode (20.). Tehnika ekstrakcije kloroformom/metanolom (29.) može se preporučiti kao standardna metoda (30.), ali kao alternativna metoda preporučuje se Smedesova metoda (31.). Potonju metodu odlikuje usporediva učinkovitost ekstrakcije, visoka razina točnosti, upotreba manje toksičnih organskih otapala i jednostavnost provedbe. Moguće je primijeniti i druge metode kod kojih je točnost veća nego kod preporučenih metoda, ako se tu primjenu opravda na odgovarajući način. Važno je navesti pojedinosti o primijenjenoj metodi.

Mjerenje rasta riba

Na početku ispitivanja potrebno je pojedinačno izvagati pet do deset riba iz matične populacije te izmjeriti njihovu ukupnu dužinu. To mogu biti iste ribe koje su upotrijebljene za analizu lipida (vidjeti stavak 56.). Masu i dužinu riba koje su upotrijebljene za svako uzorkovanje iz ispitnih i kontrolnih skupina trebalo bi mjeriti prije provođenja kemijske analize ili analize lipida. Mjerenjem tih uzorkovanih riba moguće je procijeniti masu i dužinu riba preostalih u ispitnom i kontrolnom akvariju (vidjeti stavak 45.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Krivulju apsorpcije ispitivane tvari trebalo bi dobiti grafičkim prikazom njezine koncentracije u/na ribi (ili navedenim tkivima) u fazi apsorpcije u odnosu na vrijeme na aritmetičkoj skali. Ako krivulja dosegne plato, odnosno postane približno asimptotična u odnosu na vremensku os, vrijednosti BCF-a u stabilnom stanju (BCF_{SS}) trebalo bi izračunati na sljedeći način:

$$\frac{C_f \textit{ u stabilnom stanju}(\textit{srednja vrijednost})}{C_w \textit{ u stabilnom stanju}(\textit{srednja vrijednost})}$$

▼M7

Na promjenu vrijednosti C_f može utjecati rast riba (vidjeti stavke 72. i 73.). Na prosječnu koncentraciju pri izlaganju (C_w) utječe varijacija tijekom vremena. Može se očekivati da vremenski ponderirana prosječna koncentracija bude važnija i preciznija za ispitivanja bioakumulacije, čak i ako se varijacija nalazi unutar odgovarajućeg raspona valjanosti (vidjeti stavak 24.). Vremenski ponderirana prosječna koncentracija u vodi može se izračunati u skladu s Dodatkom 5. odjeljkom 1.

Kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K) trebalo bi utvrđivati kao omjer vrijednosti k_1/k_2, dviju konstanti brzine kinetike prvog reda. Konstante brzine k_1 i k_2 te vrijednost BCF_K mogu se dobiti istovremenom prilagodbom faze apsorpcije i faze izlučivanja. Druga je mogućnost sekvencijalno utvrđivanje k_1 i k_2 (opis i usporedba tih metoda navedeni su u Dodatku 5.) Konstanta brzine izlučivanja (k_2) možda će trebati biti ispravljena u odnosu na razrjeđenje zbog rasta (vidjeti stavke 72. i 73.). Ako je očito da krivulja apsorpcije i/ili izlučivanja nije prvog reda, trebalo bi primijeniti složenije modele (vidjeti literaturu u Dodatku 5.) i potražiti savjet biostatističara i/ili farmakokinetičara.

Podaci o masi/dužini riba

Mokre mase pojedinačnih riba i njihove ukupne dužine u svim intervalima uzorkovanja iskazuju se odvojeno za ispitne i kontrolne skupine tijekom faza apsorpcije (uključujući matičnu populaciju na početku apsorpcije) i izlučivanja. Kod svake pojedinačne ribe izmjerenu masu i dužinu trebalo bi povezati s koncentracijom analizirane kemikalije, na primjer upotrebom koda jedinstvenog identifikatora za svaku uzorkovanu ribu. Za utvrđivanje rasta u svrhu ispravljanja vrijednosti kinetičkog BCF-a u odnosu na razrjeđivanje zbog rasta prednost se daje masi (vidjeti stavak 73. i Dodatak 5. za metodu koja se upotrebljava za ispravljanje podataka o razrjeđenju zbog rasta).

Ispravljanje razrjeđenja zbog rasta i normiranje lipida

Zbog rasta riba tijekom faze izlučivanja može doći do snižavanja koncentracija mjerene kemikalije u ribama što za posljedicu ima povećanje konstante brzine izlučivanja (k_2) veće od onog do kojeg bi došlo samo u postupcima uklanjanja (npr. disanje, metabolizam, izlučivanje). Kinetičke faktore biokoncentracije trebalo bi ispraviti u odnosu na razrjeđenje zbog rasta. Na vrijednost BCF_{SS} isto će tako utjecati rast, ali ne postoji dogovoren postupak za ispravljanje vrijednosti BCF_{SS} u odnosu na rast. U slučaju znatnog rasta trebalo bi utvrditi i vrijednost BCF_K ispravljenu u odnosu na rast (BCF_{Kg}) jer ona može biti važnija mjera faktora biokoncentracije. Sadržaj lipida u ispitnim ribama (koji je u znatnoj mjeri povezan s bioakumulacijom hidrofobnih tvari) može u praksi varirati toliko da je potrebno normirati utvrđen sadržaj lipida u ribi (5 % mokre mase) kako bi i kinetički faktor biokoncentracije i faktor biokoncentracije u stabilnom stanju bili predstavljeni na značajan način, osim ako se može dokazati da se ispitivana tvar ne akumulira ponajprije u lipidima (npr. određene perfluorirane tvari mogu se vezati uz proteine). Jednadžbe i primjeri za te izračune dostupni su u Dodatku 5.

Kako bi se kinetički BCF ispravio u odnosu na razrjeđenje zbog rasta, konstantu brzine izlučivanja potrebno je ispraviti u odnosu na rast. Tu se konstantu brzine izlučivanja ispravljenu u odnosu na rast (k_{2g}) izračunava oduzimanjem konstante brzine rasta (k_g, dobiven iz podataka o izmjerenoj masi) od ukupne konstante brzine izlučivanja (k_2). Kinetički faktor biokoncentracije ispravljen u odnosu na rast tada se izračunava dijeljenjem konstante brzine apsorpcije (k_1) s konstantom brzine izlučivanja ispravljenom u odnosu na rast (k_{2g}) (vidjeti Dodatak 5.). U nekim je slučajevima taj pristup neprikladan. Na primjer, kod tvari koje se izlučuju vrlo polako i ispituju u ribama koje brzo rastu, dobivena vrijednost k_{2g} može biti vrlo mala pa pogreška u dvjema konstantama brzina upotrijebljenima za dobivanje te vrijednosti postaje kritična te u nekim slučajevima procijenjena vrijednost k_g može biti viša od vrijednosti k_2. U drugom se pristupu, kojim

▼M7

se zaobilazi potreba za ispravljanjem u odnosu na razrjeđenje zbog rasta, upotrebljavaju podaci o masi izlučene ispitivane tvari po ribi (na temelju cijele ribe), a ne uobičajeni podaci o masi ispitivane tvari po jediničnoj masi ribe (koncentracija). To je lako postići jer bi se u okviru ispitivanja u skladu s ovom ispitnom metodom trebale povezivati zabilježene koncentracije u tkivu s masama pojedinačnih riba. Jednostavan postupak za to opisan je u Dodatku 5. Treba napomenuti da bi o vrijednosti k_2 trebalo izvijestiti čak i ako se upotrebljava ovaj alternativni pristup.

O faktorima kinetičke biokoncentracije i biokoncentracije u stabilnom stanju trebalo bi izvijestiti i u odnosu na zadani sadržaj lipida u ribi od 5 % (mokra masa), osim ako se može dokazati da se ispitivana tvar ne akumulira ponajprije u lipidima. Podaci o koncentraciji u ribama ili vrijednost BCF-a normiraju se u skladu s omjerom između 5 % i stvarnog (pojedinačnog) prosječnog sadržaja lipida (u % mokre mase) (vidjeti stavak 5.).

Ako kemijska analiza i analiza lipida nisu provedene na istoj ribi, normirane podatke o pojedinačnom sadržaju lipida u ribi trebalo bi upotrijebiti za izračun vrijednosti BCF-a normirane u odnosu na lipide. Druga je mogućnost, ako je rast kontrolnih i izloženih riba sličan, upotrijebiti samo sadržaj lipida u kontrolnim ribama za ispravljanje lipida (vidjeti stavak 56.). Metoda izračunavanja vrijednosti BCF-a normirane u odnosu na lipide opisana je u Dodatku 5.

Tumačenje rezultata

Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije ispitnih otopina kreću u blizini granice detekcije analitičke metode.

Prosječan se rast u ispitnim i kontrolnim skupinama u načelu ne bi trebao znatno razlikovati kako bi se isključili toksični učinci. Konstante brzine rasta ili krivulje rasta tih dviju skupina trebalo bi usporediti s pomoću odgovarajućeg postupka ([1])).

Jasno definirane krivulje apsorpcije i izlučivanja ukazuju na dobru kvalitetu podataka o biokoncentraciji. Za konstante brzine rezultati χ^2 testa prikladnosti trebali bi ukazivati na dobru razinu prikladnosti (odnosno, na niski postotak pogrešaka u mjerenju (32.)) modela bioakumulacije kako bi se konstante brzine mogle smatrati pouzdanima (vidjeti Dodatak 5.). Ako se upotrebljava više od jedne ispitne koncentracije, razlike u konstantama apsorpcije/izlučivanja između ispitnih koncentracija trebale bi iznositi manje od 20 % ([2]). U suprotnome bi se mogla utvrditi ovisnost o koncentraciji. Ako se uoče značajne razlike u konstantama brzine apsorpcije/izlučivanja između primijenjenih ispitnih koncentracija, to treba zabilježiti i dati moguća objašnjenja. Općenito se granica pouzdanosti od 95 % vrijednosti BCF-ova kod dobro strukturiranih ispitivanja nalazi blizu ±20 % izvedenog BCF-a.

Ako se ispituju dvije koncentracije ili više njih, provjerava se dosljednost rezultata za obje ili sve koncentracije te utvrđuje postoji li ovisnost o koncentraciji.

([1]) Na konstantama brzine rasta moguće je izvršiti *t*-test kako bi se ispitalo razlikuje li se rast između kontrolnih i ispitnih skupina, odnosno *F*-test u slučaju analize varijance. Prema potrebi, moguće je upotrijebiti *F*-test ili test omjera vjerojatnosti radi lakšeg odabiranja odgovarajućeg modela rasta (Monografija OECD-a br. 54, literatura (32.)).

([2]) U tim se postotcima podrazumijeva da su analitičke metode pouzdane i da trajanje poluvijeka iznosi < 14 dana. Ako su analitičke metode manje pouzdane ili je poluvijek (znatno) produžen, ti će brojevi porasti.

▼M7

Ako se ispituje samo jedna koncentracija radi smanjene upotrebe životinja i/ili sredstava, to bi trebalo opravdati.

Dobiveni BCF_{SS} dvojben je ako je vrijednost BCF_K znatno veća od vrijednosti BCF_{SS} jer to može ukazivati na činjenicu da nije postignuto stabilno stanje ili da nisu uzeti u obzir razrjeđenje zbog rasta i procesi kojima nastaju gubici. U slučajevima kad je vrijednost BCF_{SS} mnogo viša od vrijednosti BCF_K, potrebno je provjeriti postoje li pogreške u dobivenim konstantama brzine apsorpcije i izlučivanja te ih ponovno izračunati. Različitim bi se postupkom prilagođavanja moglo bolje procijeniti vrijednost BCF_K (vidjeti Dodatak 5.).

Izvješće o ispitivanju

Osim informacija o ispitivanoj tvari navedenih u stavku 3., u izvješće o ispitivanju uključuju se i informacije u nastavku.

Za ispitivanu tvar:

fizičko stanje i, prema potrebi, fizičko-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, poput IUPAC ili CAS naziva, CAS broja, SMILES ili InChI koda, strukturne formule, čistoće, kemijskog identiteta nečistoća prema potrebi i ako je praktično izvedivo itd. (uključujući sadržaj organskog ugljika, prema potrebi),

— za tvari s više sastojaka i UVCB-ove (kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali), opis, po mogućnosti, kemijskog identiteta pojedinačnih sastavnih dijelova i, za sve njih, postotak u ukupnoj masi tvari. Potrebno je ukratko opisati na koji se način u analitičkoj metodi upotrijebljenoj u ispitivanju odražava koncentracija tvari; trebalo bi opisati sve analitičke postupke, uključujući točnost metode, granicu detekcije metode i granicu kvantifikacije,

— kod radioaktivno obilježenih tvari: točan položaj obilježenog atoma (obilježenih atoma) i postotak radioaktivnosti povezan s nečistoćama,

— informacije o toksičnosti ispitivane tvari za ribe (po mogućnosti za ispitnu vrstu). Toksičnost bi trebalo prijaviti kao akutnu vrijednost 96 h LC_{50} i vrijednosti NOAEC i LOAEC iz kroničnih ispitivanja (odnosno, ispitivanja iz rane životne faze ili ispitivanja čitavog životnog ciklusa, ako su dostupna),

— uvjeti skladištenja ispitivane kemikalije ili ispitivane tvari te stabilnost ispitivane kemikalije ili ispitivane tvari u uvjetima skladištenja ako su uskladištene prije upotrebe.

Za ispitne vrste:

znanstveni naziv, subpopulacija, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, dob, spol (prema potrebi), raspon veličine (masa i dužina) itd.

Za ispitne uvjete:

— ispitni postupak (npr. protočni ili polustatički), uobičajeno ispitivanje ili skraćeno ispitivanje (uključujući razlog i opravdanje),

— vrsta i svojstva upotrijebljene rasvjete i fotoperiod (fotoperiodi),

— plan ispitivanja (npr. broj i veličina ispitnih komora, brzina izmjene vode, gustoća punjenja, broj ponovljenih uzoraka, broj riba po ponovljenom uzorku, broj ispitnih koncentracija, trajanje faze apsorpcije i izlučivanja, učestalost uzorkovanja riba i vode),

▼M7

— metoda pripreme matičnih otopina i učestalost obnavljanja (kad je se upotrebljava, trebalo bi navesti otopinu, njezinu koncentraciju i njezin doprinos sadržaju organskog ugljika u ispitnoj vodi) ili opis alternativnog sustava doziranja,

— nazivne ispitne koncentracije, prosječne izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda i učestalost kojima su dobivene,

— izvor vode za razrjeđivanje, opis mogućih prethodnih obrada, rezultati svih postupaka kojima se dokazuje da ispitne ribe mogu živjeti u vodi i svojstva vode: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, razine rezidualnog klora (ako se mjeri), ukupni organski ugljik, suspendirane krute tvari, salinitet ispitnog medija (prema potrebi) i sva druga mjerenja,

— kvaliteta vode u ispitnim posudama, pH, tvrdoća, TOC, temperatura i koncentracija otopljenog kisika, upotrijebljene metode i učestalost mjerenja,

— detaljne informacije o hranjenju, na primjer vrsta hrane, izvor, sastav (po mogućnosti barem sadržaj lipida i proteina), odabrana brzina hranjenja, količina i učestalost hranjenja,

— informacije o obradi uzoraka riba i uzoraka vode, uključujući podatke o pripremi, skladištenju, ekstrakciji i analitičkim postupcima (i preciznosti) za ispitivanu tvar i sadržaj lipida,

— metode upotrijebljene za nasumično tretiranje i dodavanje riba u ispitne posude,

— datum uvođenja ispitnih organizama u ispitnu otopinu i trajanje ispitivanja,

— opis testa za određivanje raspona i njegovi rezultati, ako su ti podaci dostupni.

Kad je riječ o rezultatima:

— rezultati svih preliminarnih istraživanja,

— smrtnost kontrolnih riba i riba u svim komorama s ispitivanom tvari te sva uočena neuobičajena ponašanja,

— informacije o svim uočenim štetnim učincima,

— potpun opis svih primijenjenih postupaka kemijske analize, uključujući granice detekcije i kvantifikacije, varijabilnosti i izdvajanja,

— sadržaj lipida u ribi, uključujući upotrijebljenu metodu i, ako je izveden, faktor normizacije lipida (L_n, faktor kojim se iskazuju rezultati vezani uz sadržaj lipida u ribi od 5 %),

— iskazani podaci o masi (i dužini) ribe, povezani s koncentracijama kemikalije u pojedinačnim ribama (i sadržajem lipida, prema potrebi), za kontrolne i izložene skupine (na primjer upotrebom jedinstvenih identifikatora za svaku uzorkovanu ribu) te izračuni dobivene konstante (konstanti) brzine rasta,

▼M7

— iskazani podaci o koncentraciji ispitivane tvari u ribi (C_f, povezano s pojedinačnim ribama) i vodi (C_w) (s prosječnim vrijednostima za ispitnu i kontrolnu skupinu, standardnim devijacijama i rasponom, prema potrebi) za sva vremena uzorkovanja (C_f, izražen u mg/kg mokre mase cijelog tijela ili određenih tkiva, na primjer lipidi, i C_w u mg/l). Vrijednosti C_w potrebno je navesti i za kontrolni niz (potrebno je izvijestiti i o temeljnim vrijednostima),

— krivulje (uključujući sve izmjerene podatke) kojima se prikazuje sljedeće (prema potrebi, koncentracije je moguće izraziti u odnosu na cijelo tijelo, a sadržaj lipida normirati na 5 % životinje ili određenih tkiva te životinje):

  — rast, odnosno masa ribe u odnosu na vrijeme ili prirodni logaritam mase u odnosu na vrijeme (uključujući dobivenu konstantu brzine rasta, k_g),

  — apsorpcija i izlučivanje ispitivane tvari u ribi (na jednom grafičkom prikazu),

  — vrijeme potrebno do postizanja stabilnog stanja (ako ga se postigne),

  — prirodni logaritam koncentracije u odnosu na vrijeme apsorpcije (uključujući dobivenu konstantu stope apsorpcije, k_1),

  — prirodni logaritam koncentracije (ln koncentracija) u odnosu na vrijeme izlučivanja (uključujući dobivenu konstantu stope izlučivanja, k_2) i

  — krivulje apsorpcije i izlučivanja koje prikazuju i podatke i prilagođeni model,

— ako se vizualnom inspekcijom grafičkog prikaza utvrde očite netipične vrijednosti, može se primijeniti statistički valjano ispitivanje netipičnih vrijednosti radi uklanjanja prividnih podatkovnih točaka te dokumentirati opravdanje za njihovo izostavljanje,

— faktor biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}), ako je postignuto stabilno stanje (ili gotovo postignuto),

— kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K) i dobivene konstante apsorpcije i izlučivanja k_1 i k_2, zajedno s varijancama vrijednosti k_2 (nagib i odsječak), ako se primjenjuje sekvencijsko prilagođavanje,

— granice pouzdanosti, standardne devijacije (ako su dostupne) i metode izračuna / analize podataka za sve parametre svih koncentracija upotrijebljene ispitivane tvari,

  — sve informacije koje se odnose na metabolite radioaktivno obilježene ispitivane tvari i njihovu akumulaciju,

  — konstanta (konstante) brzine rasta (uključujući interval (intervale) pouzdanosti od 95 % i izračunanu konstantu brzine izlučivanja ispravljenu u odnosu na rast (k_{2g}), poluvijek i vrijednosti BCF-a (BCF_{Kg}),

  — sve posebnosti ispitivanja, moguća odstupanja od ovih postupaka i sve druge relevantne informacije,

  — sažeta tablica relevantnih izmjerenih i izračunanih podataka, poput sljedeće:

▼M7

Konstante stopa apsorpcije i izlučivanja tvari i faktori biokoncentracije (BCF)	
k_g (konstanta brzine rasta; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
k_1 (konstanta stope ukupne apsorpcije; l kg^{-1} dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
k_2 (konstanta stope ukupnog izlučivanja; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
k_{2g} (konstanta stope izlučivanja ispravljena u odnosu na rast; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
C_f (koncentracija kemikalije u ribi pri stabilnom stanju; mg kg^{-1}):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
C_w (koncentracija kemikalije u vodi; mg l^{-1}):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
L_n (faktor normizacije lipida):	Unijeti vrijednost (3)
BCF_{SS} (BCF u stabilnom stanju; l kg^{-1})	Unijeti vrijednost ± SD (2)
BCF_{SSL} (BCF u stabilnom stanju s normiranim lipidima; l kg^{-1}):	Unijeti vrijednost (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetički BCF; l kg^{-1})	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (kinetički BCF ispravljen u odnosu na rast; l kg^{-1})	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (poluvijek ispravljen u odnosu na rast; dan):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (kinetički BCF s normiranim lipidima; l kg^{-1}):	Unijeti vrijednost
BCF_{KLG} (kinetički BCF ispravljen u odnosu na rast, s normiranim lipidima; l kg^{-1}):	Unijeti vrijednost

(1) CI: interval pouzdanosti (ako ga je moguće procijeniti)
(2) SD: standardna devijacija (ako ju je moguće procijeniti)

Trebalo bi izbjegavati rezultate za koje se u razvoju metode prije ispitivanja i u planu izvođenja pokusa izvješćuje da „nisu detektirani/kvantificirani na granici detekcije/kvantifikacije” jer takve rezultate nije moguće upotrijebiti za izračune konstante stopa.

C.13. – II. **SKRAĆENO ISPITIVANJE RIBA VODENIM IZLAGANJEM**

UVOD

Iz sve većeg iskustva koje su laboratoriji i regulatorna tijela stekli u provođenju i tumačenju potpunog ispitivanja vidljivo je da, uz određene iznimke, za procjenjivanje konstanti stopa apsorpcije i izlučivanja vrijedi kinetika prvog reda. Stoga je konstante stopa apsorpcije i izlučivanja moguće procijeniti uz minimalan broj točki uzorkovanja te dobiti kinetički BCF.

Početna je svrha istraživanja alternativnih planova za ispitivanje vrijednosti BCF-a bila razvoj neopsežnog ispitivanja koje je moguće primijeniti u međukoraku ispitivanja radi pobijanja ili potvrđivanja procjena vrijednosti BCF-a na temelju vrijednosti K_{OW} i alata QSAR te time ukloniti potrebu za potpunim ispitivanjem brojnih tvari te postići smanjenje troškova i upotrebe životinja zahvaljujući smanjenju broja uzoraka i slijedova analize koji se provode. Uz to što se slijedio

▼M7

glavni plan prethodne ispitne metode radi omogućivanja integracije ispitnih rezultata s postojećim podacima o vrijednosti BCF-a, a radi pojednostavnjenja provođenja ispitivanja i tumačenja podataka, cilj je bio pružiti procjene vrijednosti BCF-a odgovarajuće točnosti i preciznosti kako bi se mogle donositi odluke u pogledu procjene rizika. Primjenjuju se brojna ista razmatranja kao u potpunom ispitivanju, na primjer kriteriji valjanosti (vidjeti stavak 24.) i zaustavljanje ispitivanja ako se na kraju faze apsorpcije zaključi da je apsorpcija bila neznatna (vidjeti stavke 16. i 38.).

Tvari koje bi ispunjivale uvjete za skraćeno ispitivanje trebale bi pripadati općoj domeni za koju je ta ispitna metoda namijenjena, odnosno nepolarnim organskim tvarima (vidjeti stavak 49.). Ako postoje naznake da bi ispitivana tvar mogla reagirati drukčije (npr. jasno odstupanje od kinetike prvog reda), u regulatorne bi svrhe trebalo provesti potpuno ispitivanje.

Uobičajeno trajanje skraćenog ispitivanja nije kraće od trajanja standardnog ispitivanja vrijednosti BCF-a, ali je u njega uključeno manje uzorkovanja riba (obrazloženje se nalazi u Dodatku 6.) Međutim, razdoblje izlučivanja može se skratiti kod tvari koje se brzo izlučuju kako bi se izbjeglo da koncentracije u ribama padnu ispod granice detekcije/kvantifikacije prije kraja ispitivanja. Skraćeno ispitivanje izloženosti riba s jednom koncentracijom može se upotrijebiti kako bi se utvrdilo postoji li potreba za potpunim ispitivanjem, a ako su dobiveni podaci upotrijebljeni za izračunavanje konstanti stopa i BCF-a dobro utemeljeni (vidjeti stavak 93.) moguće je odustati od provođenja potpunog ispitivanja ako je dobiveni BCF daleko od zabrinjavajućih vrijednosti u smislu regulatornih zahtjeva.

U određenim bi slučajevima moglo biti korisno provesti skraćeni plan ispitivanja s više od jedne ispitne koncentracije kao preliminarno ispitivanje kojim se utvrđuje ovise li procjene vrijednosti BCF-a za određenu tvar o koncentraciji. Ako se utvrdi da procjene vrijednosti BCF-a iz skraćenog ispitivanja ovise o koncentraciji, bit će potrebno provesti potpuno ispitivanje. Ako se na temelju tog skraćenog ispitivanja utvrdi da procjene vrijednosti BCF-a ne ovise o koncentraciji, ali se te rezultate ne smatra konačnima, može se provesti naknadno potpuno ispitivanje s jednom koncentracijom, time umanjujući upotrebu životinja u usporedbi s potpunim ispitivanjem s dvije koncentracije (ili više njih).

Tvari koje bi mogle ispunjavati uvjete za skraćeno ispitivanje trebale bi:

— približno pokazivati kinetiku apsorpcije i izlučivanja prvog reda s izvjesnom vjerojatnošću, na primjer dobivenu iz analogije sa sličnim tvarima;

— imati vrijednost log K_{OW} < 6 osim ako se očekuje brzo metaboliziranje ([1]);

— biti u dovoljnoj mjeri topljive u vodi, uzimajući u obzir analitičku tehniku (vidjeti stavak 24.).;

— biti takve da je jasno da ih je moguće kvantificirati (odnosno koncentracije bi trebale biti najmanje jedan red veličine iznad granice kvantifikacije) i u ribama i u vodi, preporučuje se radioaktivno obilježavanje (vidjeti stavak 23.) i

— imati razdoblje izlučivanja duže od njegova predviđenog poluvijeka (izračuni su dostupni u Dodatku 5.) ili bi trajanje razdoblja izlučivanja trebalo na odgovarajući način prilagoditi (vidjeti stavak 91.). Odstupanje od ovog pravila dopušteno je ako se očekuje brzo metaboliziranje tvari.

([1]) Skraćeno bi se ispitivanje zapravo moglo upotrijebiti za dokazivanje brzog metaboliziranja kad je poznato da bi do njega moglo doći.

▼M7

RASPORED UZORKOVANJA ZA SKRAĆENA ISPITIVANJA

Uzorkovanje riba

Uzorkovanje riba svedeno je na četiri točke uzorkovanja:

— u sredini i na kraju faze apsorpcije (potonja istovremeno predstavlja i početak faze izlučivanja), na primjer nakon 14 i 28 dana (33.),

— u sredini faze izlučivanja i na kraju ispitivanja (ako koncentracija tvari iznosi < 10 % maksimalne koncentracije ili barem nakon što je očito da je jedan poluvijek tvari prošao), na primjer nakon 7 i 14 dana izlučivanja (33.). Očekuje li se ili uočava brzo izlučivanje, može biti potrebno skratiti razdoblje izlučivanja kako bi se izbjeglo da koncentracije u ribama budu ispod granice kvantifikacije,

— mjerenje lipida kao u potpunom ispitivanju,

— ispravljanje u odnosu na rast kao u potpunom ispitivanju,

— vrijednost BCF-a izračunava se kao kinetički BCF.

Uzorkovanje vode

U okviru skraćenog plana vodu se uzorkuje kao i u potpunom ispitivanju (vidjeti stavak 54.) ili u najmanje pet navrata ravnomjerno raspoređenih tijekom faze apsorpcije te na tjednoj osnovi u fazi izlučivanja.

Izmjene plana

Uzimajući u obzir svojstva ispitivane tvari, valjana predviđanja iz alata QSAR i točnu svrhu ispitivanja, mogu se razmotriti određene izmjene plana ispitivanja:

— ako je potreban veći stupanj preciznosti može se upotrijebiti više riba (šest ili osam umjesto četiri) za uzorkovanje na kraju faze apsorpcije,

— uključivanje „dodatne” skupine riba koje se upotrebljava ako izlučivanje u trajanju od 14 dana (ili predviđeni kraj faze izlučivanja) nije bilo dovoljno za odgovarajuće izlučivanje (odnosno > 50 %). Ako je predviđeno trajanje faze izlučivanja kraće ili duže od 14 dana, trebalo bi prilagoditi raspored uzorkovanja (odnosno jedna skupina riba na predviđenom kraju faze izlučivanja i jedna skupina nakon polovine tog vremena),

— upotreba dviju ispitnih koncentracija radi istraživanja moguće ovisnosti o koncentraciji. Ako rezultati skraćenog ispitivanja provedeni s dvjema ispitnim koncentracija ukažu na to da vrijednost BCF-a ne ovisi o koncentraciji (odnosno razlikuje se manje od 20 %), u potpunom se ispitivanju, ako ga se provodi, može razmotriti jedna koncentracija,

— čini se vjerojatnim da se modele procesa bioakumulacije poput onih koje predlaže Arnot *et al.* (35.) može upotrijebiti kao pomoć pri planiranju dužine faza apsorpcije i izlučivanja (vidjeti i Dodatak 5.).

Izračuni

Ovaj se pristup opravdava činjenicom da je faktor biokoncentracije u potpunom ispitivanju moguće utvrditi kao faktor biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}) izračunavanjem omjera koncentracije ispitivane tvari u tkivu ribe u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u vodi, ili izračunavanjem kinetičkog faktora biokoncentracije (BCF_K) kao omjera konstante brzine apsorpcije k_1 u odnosu na konstantu brzine izlučivanja k_2. Vrijednost BCF_K valjana je čak i

▼M7

ako se tijekom faze apsorpcije ne postigne koncentracija tvari u stabilnom stanju, pod uvjetom da se faze apsorpcije i izlučivanja odvijaju u skladu s procesima kinetike prvog reda. Potrebne su najmanje dvije podatkovne točke kako bi se procijenile konstante stope apsorpcije i izlučivanja, jedna na kraju faze apsorpcije (odnosno na početku faze izlučivanja) i jedna na kraju (ili nakon znatnog dijela) faze izlučivanja. Srednja točka uzorkovanja preporučuje se radi provjere kinetike apsorpcije i izlučivanja ([1]). Za izračun vidjeti dodatke 5. i 6.

Tumačenje rezultata

Kako bi se procijenile valjanost i informacijska vrijednost ispitivanja, provjerava se prelazi li razdoblje izlučivanja jedan poluvijek. Isto tako, vrijednost BCF_{Km} (kinetički BCF dobiven iz skraćenog ispitivanja) trebalo bi usporediti s vrijednošću BCF_{SS} iz skraćenog ispitivanja (vrijednost BCF_{SS} izračunana na kraju faze apsorpcije, pod pretpostavkom da je postignuto stabilno stanje. To je moguće samo pretpostaviti jer dokazivanje nije moguće zbog nedovoljnog broja točki uzorkovanja). Ako je $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ iz skraćenog ispitivanja, vrijednosti BCF_{SS} iz skraćenog ispitivanja trebalo bi dati prednost. Ako BCF_{Km} iznosi manje od 70 % vrijednosti BCF_{SS} iz skraćenog ispitivanja, rezultati nisu valjani i trebalo bi provesti potpuno ispitivanje.

Ako se iz skraćenog ispitivanja dobije vrijednost BCF_{Km} koja predstavlja razlog za zabrinutost u smislu regulatornih zahtjeva, trebalo bi provesti potpuno ispitivanje. Ako je rezultat daleko od zabrinutosti u smislu regulatornih zahtjeva (znatno iznad ili ispod), potpuno ispitivanje možda neće biti potrebno ili će biti moguće provesti potpuno ispitivanje s jednom koncentracijom ako se to zahtijeva relevantnim regulatornim okvirom.

Ako se utvrdi da je potpuno ispitivanje potrebno nakon skraćenog ispitivanja s jednom koncentracijom, može ga se provesti s drugom koncentracijom. Ako su rezultati dosljedni, može se odustati od daljnjeg potpunog ispitivanja pri različitoj koncentraciji jer se ne očekuje da će biokoncentracija tvari ovisiti o koncentraciji. Ako je skraćeno ispitivanje provedeno s dvije koncentracije te rezultati nisu ukazivali na ovisnost o koncentraciji, potpuno ispitivanje moguće je provesti sa samo jednom koncentracijom (vidjeti stavak 87.).

Izvješće o ispitivanju

U izvješće o ispitivanju za skraćeno ispitivanje trebale bi biti uključene sve informacije potrebne za potpuno ispitivanje (vidjeti stavak 81.), osim onih koje nije moguće obrazložiti (npr. krivulja koja pokazuje vrijeme potrebno za postizanje stabilnog stanja i faktor biokoncentracije u stabilnom stanju; za potonji bi trebalo navesti vrijednost BCF_{SS} iz skraćenog ispitivanja). Nadalje, trebalo bi navesti i razlog za upotrebu skraćenog ispitivanja i vrijednosti BCF_{Km} koja je iz njega proizišla.

C.13. – III. ISPITIVANJE BIOAKUMULACIJE U RIBAMA IZLAGANJEM KROZ HRANU

UVOD

Metodu opisanu u ovom odjeljku trebalo bi upotrebljavati za tvari kod kojih nije izvediva metodologija vodenog izlaganja (na primjer zbog toga što nije moguće održati stabilne, mjerljive koncentracije u vodi ili postići odgovarajuća tjelesna opterećenja unutar 60 dana izlaganja; vidjeti prethodne odjeljke o metodi vodenog izlaganja). Ipak, potrebno je naglasiti da će krajnji rezultat ovog ispitivanja biti faktor biomagnifikacije kroz hranu (BMF), a ne faktor biokoncentracije (BCF) ([2]).

Na konferenciji organizacije SETAC Europe održanoj u Madridu u svibnju 2001. predstavljena je nova metoda za ispitivanje bioakumulacije organskih tvari koje su slabo topljive u vodi (36.). Taj se rad temelji na različitim ispitivanjima bioakumulacije dostupnima u literaturi u kojima je upotrijebljena metoda doziranja koja uključuje hranu s dodatkom (*spiked feed*) (npr. 37.). Početkom 2004.

([1]) Ako se mjere samo dvije podatkovne točke, moguće je procijeniti granice pouzdanosti za vrijednost BCF_{Km} upotrebom metode samodopunjavanja („bootstrap”). Ako su dostupne i srednje podatkovne točke, granice pouzdanosti za vrijednost BCF_{Km} moguće je izračunati kao u potpunom ispitivanju.

([2]) Definicije i jedinice navedene su u Dodatku 1.

▼M7

radnoj skupini EU-a za tvari s postojanim, bioakumulativnim i otrovnim svojstvima dostavljen je nacrt protokola (38.) osmišljenog za mjerenje potencijala bioakumulacije organskih tvari koje su slabo topljive u vodi i za koje nije moguće provesti standardnu metodu ispitivanja biokoncentracije vodenim izlaganjem, zajedno s popratnim dokumentom (39.). Dodatno je pojašnjenje za tu metodu bilo da do potencijalne izloženosti okoliša takvim tvarima slabe topljivosti (odnosno čija je vrijednost log K_{OW} > 5) uglavnom može doći kroz hranu (vidjeti 40., 41., 42., 43., 44.). Stoga se na ispitivanja izlaganjem kroz hranu upućuje u određenim objavljenim uredbama o kemikalijama ([1]). Međutim, potrebno je naglasiti da se u metodi koja se ovdje opisuje pažljivo izbjegava izlaganje kroz vodenu fazu te se stoga vrijednost BMF-a iz ove ispitne metode ne može izravno usporediti s vrijednošću BMF-a iz terenskih ispitivanja (u kojima je moguće kombinirati vodeno izlaganje i izlaganje kroz hranu).

Ovaj se odjeljak trenutačne ispitne metode temelji na protokolu (38.) te je riječ o novoj metodi koja nije objavljena u prethodnoj verziji ispitne metode C.13. Ovim se alternativnim ispitivanjem omogućuje izravno istraživanje puta izlaganja kroz hranu u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Potencijalni istraživači trebali bi konzultirati stavke od 1. do 14. ove ispitne metode kako bi saznali kad se ispitivanju izlaganjem kroz hranu daje prednost nad ispitivanjem vodenim izlaganjem. Navedene su informacije o različitim razmatranjima u pogledu tvari te bi ih trebalo uzeti u obzir prije provođenja ispitivanja.

Upotreba radioaktivno obilježenih ispitivanih tvari može se uzeti u obzir uz slična razmatranja kao i kod metode vodenog izlaganja (vidjeti stavke 6. i 65.).

Metoda izlaganja kroz hranu može se upotrijebiti kako bi se ispitalo više od jedne tvari u jednom ispitivanju, pod uvjetom da su ispunjeni određeni kriteriji; njih se dodatno istražuje u stavku 112. U svrhu pojednostavnjenja, u ovoj se metodologiji opisuje ispitivanje upotrebom samo jedne ispitivane tvari.

Ispitivanje izloženošću kroz hranu u mnogočemu je slično metodi vodenog izlaganja, uz očitu iznimku načina izlaganja. Stoga se brojni aspekti metode koja je ovdje opisana preklapaju s metodom vodenog izlaganja opisanom u prethodnom odjeljku. U najvećoj su mogućoj mjeri omogućena upućivanja na relevantne stavke prethodnog odjeljka, ali u interesu čitljivosti i razumijevanja neophodan je određeni stupanj ponavljanja.

NAČELO ISPITIVANJA

Mogu se primijeniti protočni ili polustatički uvjeti (vidjeti stavak 4.); protočni se uvjeti preporučuju radi ograničavanja potencijalne izloženosti ispitivane tvari putem vode kao posljedica desorpcije iz hrane s dodatkom ili izmeta. Ispitivanjem su obuhvaćene dvije faze: apsorpcija (hrana s dodatkom ispitivane tvari) i izlučivanje (čista, neobrađena hrana) (vidjeti stavak 16.). U fazi apsorpcije „ispitnu” skupinu riba svakodnevno se hrani utvrđenim obrocima komercijalne hrane za ribe poznatog sastava s dodatkom ispitivane tvari. Ribe bi, po mogućnosti, trebale pojesti svu hranu koja im je ponuđena (vidjeti stavak 141.). Zatim se, u fazi izlučivanja, ribama daje čista, neobrađena komercijalna hrana za ribe. Kao i kod metode vodenog izlaganja, moguće je, prema potrebi, upotrijebiti više od jedne ispitne skupine s različitim koncentracijama dodane ispitivane tvari, ali za većinu je izrazito hidrofobnih organskih ispitivanih tvari dovoljna jedna ispitna skupina (vidjeti stavke 49. i 107.). Ako se upotrebljavaju polustatički uvjeti, ribe bi trebalo premjestiti u novi medij i/ili novu ispitnu komoru na kraju faze apsorpcije (u slučaju da su medij i/ili oprema koji su upotrijebljeni u fazi apsorpcije kontaminirani ispitivanom tvari putem ispiranja). Koncentracije

([1]) Za potrebe Uredbe (EZ) br. 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) (SL L 396, 30.12.2006., str. 1.), to je pitanje uključeno u „Smjernice o zahtjevima obavješćivanja i procjeni kemijske sigurnosti”, poglavlja R.7c, R.7.10.3.1. i R.7.10.4.1. i slika R7.10-2.

▼M7

ispitivane
tvari u ribama mjere se u objema fazama ispitivanja. Uz skupinu riba koje se hrani hranom s dodatkom (ispitna skupina), u istim se uvjetima drži i kontrolna skupina riba te ih se hrani na isti način, ali njihovoj se komercijalnoj hrani za ribe ne dodaje ispitivana tvar. Tom se kontrolnom skupinom omogućuje dobivanje temeljnih razina ispitivane tvari koje je potrebno kvantificirati kod neizloženih riba i koje služe za usporedbu svih štetnih posljedica vezanih uz tretiranje koje su uočene u ispitnoj skupini (skupinama) ([1]). Omogućuje se i usporedba konstanti brzine rasta između skupina kao provjera toga jesu li konzumirane slične količine ponuđene hrane (moguće razlike u okusu hrana isto bi tako trebalo uzeti u obzir u obrazloženju različitih konstanti brzine rasta; vidjeti stavak 138.). Važno je da se ispitne i kontrolne skupine tijekom faza apsorpcije i izlučivanja hrani obrocima koji su istovrijedni u smislu hranjivosti.

Na temelju iskustva stručnjaka koji su razvili metodu zaključeno je da je uobičajeno dovoljna faza apsorpcije koja traje od 7 do 14 dana (38., 39.). Zahvaljujući tom rasponu trebali bi se smanjiti troškovi provođenja ispitivanja, istovremeno osiguravajući dostatno izlaganje za većinu tvari. Međutim, u određenim je slučajevima moguće produžiti fazu apsorpcije (vidjeti stavak 127.). Tijekom faze apsorpcije koncentracija tvari u ribi možda neće postići stabilno stanje pa se obrada podataka i rezultati iz te metode uglavnom temelje na kinetičkoj analizi ostataka u tkivu. (Napomena: Jednadžbe za procjenu vremena potrebnog za postizanje stabilnog stanja ovdje se mogu primijeniti na isti način kao u ispitivanju vodenim izlaganjem, vidjeti Dodatak 5.). Faza izlučivanja započinje kad se ribe prvi put hrani hranom bez dodatka, a uobičajeno traje najviše 28 dana ili do trenutka kad više nije moguće kvantificirati ispitnu tvar u cijeloj ribi, ovisno o tome što nastupi prije. Faza izlučivanja može se skratiti ili je se može produžiti na dulje od 28 dana, ovisno o promjenama do kojih s vremenom dođe u izmjerenim koncentracijama kemikalije i veličini riba.

Tom se metodom omogućuje utvrđivanje poluvijeka vezanog uz tvar ($t_{1/2}$, iz konstante stope izlučivanja, k_2), učinkovitosti asimilacije (apsorpcija u cijeloj utrobi; a), kinetičkog faktora biomagnifikacije kroz hranu (BMF_K), kinetičkog faktora biomagnifikacije kroz hranu ispravljenog u odnosu na rast (BMF_{Kg}) te kinetičkog faktora biomagnifikacije kroz hranu ispravljenog u odnosu na lipide ([2]) (BMF_{KL}) (i/ili kinetičkog faktora biomagnifikacije kroz hranu ispravljenog u odnosu na rast i lipide, BMF_{KgL}) za ispitivanu tvar u ribi. Kao i u metodi vodenog izlaganja povećanje mase riba tijekom ispitivanja za posljedicu će imati razrjeđenje ispitivane tvari u ribama koje rastu te će se zbog toga podcijeniti kinetički BMF ako ga se ne ispravi u odnosu na rast (vidjeti stavke 162. i 163.). Nadalje, ako se procijeni da je u fazi apsorpcije postignuto stabilno stanje, moguće je izračunati indikativnu vrijednost BMF-a u stabilnom stanju. Dostupni su pristupi zahvaljujući kojima je izvediva procjena kinetičkog faktora biokoncentracije (BCF_K) na temelju podataka dobivenih iz ispitivanja kroz hranu (npr. 44., 45., 46., 47., 48.). Prednosti i nedostaci tih pristupa navedeni su u Dodatku 8.

([1]) Kod većine ispitivanih tvari u idealnim uvjetima ne bi trebalo doći do detekcije u kontrolnoj vodi. Pozadinske koncentracije trebale bi biti relevantne samo za materijale koji se javljaju prirodno (npr. određene metale) i tvari koje su sveprisutne u okolišu.

([2]) Budući da je BMF definiran kao omjer koncentracije tvari u organizmu u odnosu na koncentraciju u hrani kojom se hrani organizam pri stabilnom stanju, lipide se uzima u obzir ispravljanjem vrijednosti u odnosu na sadržaj lipida u organizmu i u hrani te se stoga točnije opisuje kao „ispravljanje”. Taj se pristup razlikuje od „normiranja” na određeni sadržaj lipida u organizmu koji se primjenjuje u ispitivanju biokoncentracije vodenim izlaganjem.

▼M7

Ispitivanje je prije svega osmišljeno za slabo topljive nepolarne organske tvari koje približno prate kinetiku apsorpcije i izlučivanja prvog reda kod riba. Ako se ispituje tvar koja ne prati približno kinetiku apsorpcije i izlučivanja prvog reda, trebalo bi primijeniti složenije modele (vidjeti literaturu u Dodatku 5.) i potražiti savjet biostatističara i/ili farmakokinetičara.

Vrijednost BMF uobičajeno se utvrđuje primjenom analize ispitivane tvari na cijeloj ribi (na temelju mokre mase). Ako je to relevantno za ciljeve ispitivanja, određena je tkiva (npr. mišiće, jetra) moguće uzorkovati ako se ribu podijeli u jestive i nejestive dijelove (vidjeti stavak 21.). Nadalje, moguće je ukloniti probavni trakt i zasebno ga analizirati kako bi se utvrdilo koliko su točke uzorkovanja na kraju faze apsorpcije i blizu početka faze izlučivanja pridonijele koncentracijama u cijeloj ribi, ili kao dio pristupa u kojem se primjenjuje bilanca mase.

Sadržaj lipida u uzorkovanoj cijeloj ribi trebalo bi mjeriti tako da je moguće ispraviti koncentracije u odnosu na lipide, uzimajući u obzir sadržaj lipida u hrani i u ribi (vidjeti stavke 56. i 57. te Dodatak 7.).

Trebalo bi mjeriti i evidentirati masu uzorkovanih jedinki te je povezati s analiziranom koncentracijom kemikalije za tu jedinku (npr. prijavljenu upotrebom koda jedinstvenog identifikatora za svaku uzorkovanu ribu) za potrebe izračuna rasta do kojeg bi moglo doći tijekom ispitivanja. Po mogućnosti bi trebalo izmjeriti i ukupnu dužinu ribe ([1]). Podaci o masi potrebni su i za procjenu vrijednosti BCF-a upotrebom podataka o izlučivanju dobivenih ispitivanjem kroz hranu.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Trebale bi biti dostupne informacije o ispitivanoj tvari kako su opisane u stavcima 3. i 22. Analitička metoda za koncentracije ispitivane tvari u vodi uobičajeno nije potrebna; potrebno je primijeniti metode koje su dovoljno osjetljive za mjerenje koncentracija u hrani za ribe i tkivu riba.

Metoda se može upotrijebiti kako bi se ispitalo više od jedne tvari u jednom ispitivanju. Međutim, ispitivane tvari trebale bi biti međusobno kompatibilne na način kojim se osigurava da neće doći do interakcije ili promjene njihova kemijskog identiteta nakon što ih se doda hrani za ribe. Cilj je da se izmjereni rezultati za sve ispitivane tvari koje se ispituje zajedno ne razlikuju uvelike od rezultata do kojih bi došlo da su na svakoj ispitivanoj tvari provođena zasebna ispitivanja. Preliminarnim analizama trebalo bi utvrditi da je svaku tvar moguće izdvojiti iz hrane i uzorka tkiva ribe kojima je dodano više tvari uz i. visoku stopu izdvajanja (npr. > 85 % nazivne vrijednosti) i ii. osjetljivost potrebnu za ispitivanje. Ukupna doza tvari koje se ispituje zajedno trebala bi biti ispod kombinirane koncentracije zbog koje bi moglo doći do toksičnih učinaka (vidjeti stavak 51.). Nadalje, moguće štetne učinke u ribama i potencijal za interaktivne učinke (npr. metabolički učinci) povezane s istovremenim ispitivanjem više tvari trebalo bi uzeti u obzir u planu izvođenja pokusa. Trebalo bi izbjegavati istovremeno ispitivanje ionizirajućih tvari. U smislu izlaganja, metoda je primjenjiva i na složene smjese (vidjeti stavak 13., iako se primjenjuju ista ograničenja u analizi kao i u svim drugim metodama).

VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete (vidjeti stavak 24.):

— odstupanja temperature vode iznose manje od ±2 °C kod tretiranih ili kontrolnih skupina,

([1]) Tijekom ispitivanja trebalo bi evidentirati i ukupnu dužinu jer je ona dobar pokazatelj toga je li došlo do štetnog učinka.

▼M7

— koncentracija otopljenog kisika ne smije pasti ispod 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom,

— koncentracija ispitivane tvari u hrani za ribe prije faze apsorpcije i na njezinu kraju nalazi se u rasponu od ±20 % (na temelju najmanje triju uzoraka u objema vremenskim točkama),

— u preliminarnoj analizi hrane kojoj je dodana tvar trebalo bi dokazati visok stupanj homogenosti tvari u hrani; najmanje tri uzorka koncentracije tvari uzeta na početku ispitivanja ne bi smjela odstupati više od ±15 % od srednje vrijednosti,

— koncentracije ispitivane tvari nisu detektirane, ili su prisutne samo u uobičajenim tragovima, u hrani kojoj nije dodana tvar ili tkivima kontrolnih riba u odnosu na tretirane uzorke,

— smrtnost i drugi štetni učinci / bolest kod kontrolnih i ispitivanih skupina riba na kraju ispitivanja trebali bi iznositi < 10 %; ako se ispitivanje iz bilo kojeg razloga produžuje, štetni učinci u objema skupinama iznose ≤ 5 % mjesečno i ≤ 30 % zajedno. Znatne razlike u prosječnom rastu između ispitnih i kontrolnih skupina uzorkovanih riba mogu ukazivati na toksičan učinak ispitivane tvari.

REFERENTNE TVARI

Ako laboratorij nije ranije proveo test ili ako je došlo do znatnih promjena (primjerice promjene riblje subpopulacije ili dobavljača, različite vrste riba, znatne promjene veličine riba, hrana za ribe ili metoda dodavanja tvari (*spiking*) itd.), savjetuje se provedba studije tehničke osposobljenosti upotrebom referentne tvari. Referentna tvar prije svega se upotrebljava kako bi se utvrdilo je li tehnika dodavanja tvari hrani primjerena za osiguravanje najveće mjere homogenosti i biodostupnosti ispitivanih tvari. Jedan je od primjera upotrijebljenih u slučaju nepolarnih hidrofobnih tvari heksaklorobenzen (HCB), ali bi zbog njegovih opasnih svojstava trebalo razmotriti druge tvari za koje postoje pouzdani podaci o apsorpciji i biomagnifikaciji ([1]). Ako se upotrebljava referentna tvar, u izvješću o ispitivanju trebalo bi, kao i za ispitivane tvari, navesti osnovne informacije o njoj, uključujući naziv, čistoću, CAS broj, strukturu, podatke o toksičnosti (ako postoje) (vidjeti stavke 3. i 22.).

OPIS METODE

Oprema

Trebalo bi upotrebljavati materijale i opremu opisane u metodi vodenog izlaganja (vidjeti stavak 26.). Trebalo bi upotrebljavati sustav protočnog ispitivanja ili statičkog ispitivanja s obnavljanjem u okviru kojeg se za ispitne akvarije osigurava dostatan obujam vode za razrjeđivanje. Trebalo bi evidentirati brzinu protoka.

Voda

Trebalo bi upotrebljavati ispitnu vodu kako je opisano u metodi vodenog izlaganja (vidjeti stavke od 27. do 29.). Ispitni medij trebao bi imati opisana obilježja te bi njegova kvaliteta trebala ostati nepromijenjena tijekom cijelog ispitivanja. Sadržaj prirodnih čestica i ukupnog organskog ugljika trebali bi biti što je moguće niži (≤ 5 mg/l lebdećih čestica; ≤ 2 mg/l ukupnog organskog ugljika) prije početka ispitivanja. Ukupni organski ugljik potrebno je mjeriti samo prije ispitivanja kao dio ispitivanja obilježja ispitne vode (vidjeti stavak 53.).

([1]) HCB je naveden u prilozima A i C Stockholmskoj konvenciji te u prilozima I. i III. Uredbi (EZ) br. 850/2004 o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (SL L 158, 30.4.2004., str. 7.).

▼M7

Prehrana

Preporučuje se komercijalno dostupna hrana za ribe (hrana u peletima koji plutaju i/ili sporo tonu) za koju je barem poznat sadržaj proteina i masti. Peleti u hrani trebali bi biti jednake veličine kako bi se povećala učinkovitost izloženosti hrani, odnosno ribe će pojesti više hrane nego kad jedu veće komade, a ostavljaju manje. Veličina peleta trebala bi odgovarati veličini riba na početku ispitivanja (npr. mogu se upotrebljavati peleti promjera od otprilike 0,6 do 0,85 mm za ribe ukupne dužine između 3 i 7 cm te oni od 0,85 do 1,2 mm za ribe ukupne dužine između 6 i 12 cm). Veličinu peleta moguće je prilagoditi ovisno o rastu riba na početku faze izlučivanja. Primjer odgovarajućeg sastava komercijalne hrane nalazi se u Dodatku 7. U razvoju ove metode upotrijebljena je ispitna hrana ukupnog sadržaja lipida između 15 i 20 % (mokre mase). Hrana za ribe s tako visokom koncentracijom lipida možda nije dostupna u određenim regijama. U tom je slučaju moguće provesti ispitivanja s nižom koncentracijom lipida u hrani te, prema potrebi, prilagoditi brzinu hranjenja na odgovarajući način kako bi se održalo zdravlje riba (na temelju preliminarnog ispitivanja). Ukupni sadržaj lipida u hrani za ispitnu skupinu i kontrolnu skupinu potrebno je izmjeriti i evidentirati prije početka ispitivanja i na kraju faze apsorpcije. Pojedinosti koje je dostavio dobavljač komercijalne hrane u pogledu hranjivih tvari, vlage, vlakana i pepela te mogućih ostataka minerala i pesticida (npr. „standardni” prioritetni onečišćivači) trebalo bi navesti u izvješću o ispitivanju.

Pri dodavanju ispitivane tvari hrani trebalo bi učiniti sve kako bi se osigurala njezina homogenost u ispitnoj hrani. Koncentraciju ispitivane tvari u hrani namijenjenoj ispitnoj skupini trebalo bi odabrati uzimajući u obzir osjetljivost analitičke tehnike, toksičnost ispitivane tvari (NOEC ako je poznat) i relevantne fizičko-kemijske podatke. Ako se upotrebljava referentna tvar, njezina bi koncentracija prema mogućnosti trebala iznositi otprilike 10 % koncentracije ispitivane tvari (u svakom slučaju što je moguće niže), podložno analizi osjetljivosti (npr. za heksaklorobenzen kao prihvatljiva je utvrđena koncentracija u hrani od 1 do 100 μg/g; vidjeti (47.) za više informacija o učinkovitosti asimilacije HCB-a).

Ispitivanu je tvar moguće dodati hrani za ribe na nekoliko načina, ovisno o njezinim fizičkim svojstvima i topljivosti (više pojedinosti o metodama dodavanja navedeno je u Dodatku 7.):

— ako je tvar topljiva i stabilna u pogledu triglicerida, trebalo bi je otopiti u maloj količini ribljeg ulja ili jestivog biljnog ulja prije miješanja s hranom za ribe. U tom bi slučaju trebalo voditi računa o tome da se ne dobije obrok s previsokim sadržajem lipida, uzimajući u obzir prirodni sadržaj lipida u hrani s dodatkom, dodavanjem minimalne poznate količine ulja potrebne za postizanje raspodjele i homogenosti ispitivane tvari u hrani ili,

— hrani bi trebalo dodati dodatak uz upotrebu odgovarajućeg organskog otapala, pod uvjetom da se ne ugrožavaju homogenost i biodostupnost (moguće je da će se u hrani stvoriti (mikro)kristalići ispitivane tvari zbog isparavanja otapala te se ne može na jednostavan način provjeriti je li do toga došlo ili nije; vidjeti (49)) ili,

— neviskozne tekućine trebalo bi dodavati izravno u hranu za ribe, ali sve zajedno treba dobro promiješati radi postizanja homogenosti i omogućivanja dobre asimilacije. Tehnikom miješanja trebalo bi osigurati homogenost hrane s dodatkom.

▼M7

U nekim će slučajevima, na primjer kod manje hidrofobnih tvari za koje je vjerojatnije da će se desorbirati iz hrane, možda biti potrebno prekriti pelete hrane malom količinom kukuruznog/ribljeg ulja (vidjeti stavak 142.). U tim bi slučajevima kontrolnu hranu trebalo tretirati na sličan način te upotrijebiti konačnu pripremljenu hranu za mjerenje lipida.

Ako se upotrebljava referentna tvar, ona bi trebala biti usporediva s podacima iz literature o ispitivanjima provedenima u sličnim uvjetima s usporedivom brzinom hranjenja (vidjeti stavak 45.) te bi parametri specifični za referentnu tvar trebali ispunjavati relevantne kriterije iz stavka 113. (točke 3., 4. i 5.).

Ako se kao nosač ispitivane tvari upotrebljava ulje ili otapalo nosač, njegovu bi istovrijednu količinu (bez ispitivane tvari) trebalo umiješati u kontrolnu prehranu radi održavanja istovrijednosti s hranom s dodatkom. Važno je da se ispitne i kontrolne skupine tijekom faza apsorpcije i izlučivanja hrani obrocima koji su istovrijedni u smislu hranjivosti.

Hranu s dodatkom trebalo bi skladištiti u uvjetima u kojima se održava stabilnost ispitivane tvari u smjesi hrane (npr. rashlađivanjem) te bi trebalo izvijestiti o tim uvjetima.

Odabir ribljih vrsta

Mogu se upotrebljavati iste riblje vrste kao za vodeno izlaganje (vidjeti stavak 32. i Dodatak 3.). Kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*), šaran (*Cyprinus carpio*) i debeloglava gavčica (*Pimephales promelas*) uobičajeno su, prije objave ove ispitne metode, upotrebljavane u ispitivanjima bioakumulacije kroz hranu s organskim tvarima. Odlika ispitne vrste trebala bi biti brzo konzumiranje osiguranog obroka kako bi se osiguralo da se svi čimbenici koji bi mogli utjecati na koncentraciju ispitivane tvari u hrani (npr. ispiranje u vodu i mogućnost vodenog izlaganja) svedu na najmanju moguću razinu. Trebalo bi upotrebljavati ribe unutar preporučenog raspona veličine/mase (vidjeti Dodatak 3.). Ribe ne bi smjele biti toliko male da se ugrozi jednostavnost provođenja analiza na pojedinačnim ribama. Zbog vrsta koje se ispituje tijekom faze života u kojoj brzo rastu može doći do otežanog tumačenja podataka, a velike brzine rasta mogu utjecati na izračun učinkovitosti asimilacije ([1]).

Držanje riba

Aklimatizacija, smrtnost i kriteriji prihvatljivosti bolesti prije provođenja ispitivanja jednaki su kao i u metodi vodenog izlaganja (vidjeti stavke od 33. do 35.).

PROVOĐENJE ISPITIVANJA

Radnje prije ispitivanja i test za određivanje raspona

Analize prije ispitivanja potrebne su kako bi se dokazalo izdvajanje tvari iz hrane s dodatkom ili tkiva s dodatkom. Za odabir odgovarajuće koncentracije u hrani nije uvijek potrebno provesti test za utvrđivanje raspona. Za potrebe dokazivanja da nisu otkriveni štetni učinci i radi ocjene okusa hrane s dodatkom, osjetljivosti analitičke metode za tkivo riba i hranu za ribe te odabira odgovarajuće brzine hranjenja i intervala uzorkovanja tijekom faze izlučivanja itd., moguće je provesti

([1]) Zbog brzog rasta u fazi apsorpcije stvarna brzina hranjenja bit će niža od one određene na početku izlaganja.

▼M7

preliminarne pokuse u pogledu hranjenja, ali oni nisu obvezni. Preliminarno bi ispitivanje moglo biti korisno radi procjene količine riba potrebne za uzorkovanje tijekom faze izlučivanja. To može za posljedicu imati znatno smanjenje količine riba koje se upotrebljava, posebno kod ispitivanih tvari koje su osobito osjetljive na metaboliziranje.

Uvjeti izlaganja

Trajanje faze apsorpcije

Uobičajeno je dostatna faza apsorpcije u trajanju od 7 do 14 dana, tijekom koje se jednu skupinu riba svakodnevno hrani kontrolnom hranom, a drugu skupinu riba ispitnom hranom, u fiksnim obrocima ovisno o vrsti koju se ispituje i uvjetima pokusa, na primjer u količini od 1 do 2 % tjelesne mase (mokre mase) u slučaju kalifornijske pastrve. Brzinu hranjenja trebalo bi odrediti tako da se izbjegnu brz rast i veliko povećanje sadržaja lipida. Moguće je, prema potrebi, produljiti fazu apsorpcije na temelju praktičnog iskustva iz prethodnih ispitivanja ili znanja u pogledu apsorpcije/izlučivanja ispitivane tvari (ili tvari koja joj je slična). Početkom ispitivanja smatra se trenutak prvog hranjenja hranom s dodatkom. Pokusni dan traje od trenutka hranjenja do neposredno prije trenutka sljedećeg hranjenja (npr. jedan sat). Stoga prvi pokusni dan apsorpcije traje od trenutka prvog hranjenja hranom s dodatkom do neposredno prije trenutka drugog hranjenja hranom s dodatkom. U praksi, faza apsorpcije završava neposredno prije (npr. jedan sat) prvog hranjenja ispitnom tvari bez dodatka jer će ribe i dalje probavljati hranu s dodatkom i apsorbirati ispitivanu tvar tijekom sljedeća 24 sata. Važno je osigurati da se postigne dostatno visoko (netoksično) tjelesno opterećenje ispitivanom tvari u odnosu na analitičku metodu, tako da se tijekom faze izlučivanja može izmjeriti barem smanjenje reda veličine. U posebnim je slučajevima moguće primijeniti dužu fazu apsorpcije (do 28 dana), uz dodatno uzorkovanje, radi dobivanja uvida u kinetiku apsorpcije. Tijekom apsorpcije koncentracija u ribi možda neće postići stabilno stanje. Kao i u ispitivanju vodenim izlaganjem, moguće je primijeniti jednadžbe za procjenu vremena potrebnog do stabilnog stanja, kao pokazatelja vjerojatnog vremena potrebnog za postizanje znatnih koncentracija u ribi (vidjeti Dodatak 5.).

U određenim bi slučajevima moglo biti poznato da apsorpcija tvari u ribi tijekom 7 do 14 dana neće biti dovoljna da bi koncentracija hrane koju se upotrebljava postigla koncentraciju u ribi koja je dovoljno visoka da bi se analiziralo barem smanjenje reda veličine tijekom izlučivanja, ili zbog niske analitičke osjetljivosti ili zbog niske učinkovitosti asimilacije. U tim bi slučajevima moglo biti korisno produžiti početnu fazu hranjenja na dulje od 14 dana ili, posebno za tvari s visokim metaboliziranjem, razmotriti višu koncentraciju hrane. Međutim, trebalo bi voditi računa o tome da se tjelesno opterećenje tijekom apsorpcije održava ispod (procijenjene) kronične koncentracije bez učinka u tkivu riba (vidjeti stavak 138.).

Trajanje faze izlučivanja

Izlučivanje uobičajeno traje do 28 dana, a počinje kad se ispitnu skupinu riba počne hraniti čistom, neobrađenom hranom nakon faze apsorpcije. Izlučivanje započinje prvim hranjenjem hranom bez dodatka (*unspiked*), a ne neposredno nakon zadnjeg hranjenja hranom s dodatkom (*spiked*) jer će ribe nastaviti probavljati hranu i apsorbirati ispitivanu tvar u sljedeća 24 sata, kako je navedeno u stavku 126. Stoga se prvi uzorak u fazi izlučivanja uzima neposredno prije drugog hranjenja hranom bez dodatka. To je razdoblje izlučivanja namijenjeno hvatanju tvari čiji potencijalni poluvijek traje do 14 dana, što je u skladu s poluvijekom bioakumulacijskih tvari ([1]) pa su razdobljem od 28 dana obuhvaćena

([1]) U ispitivanju vodenim izlaganjem 14-dnevni poluvijek odgovarao bi vrijednosti BCF-a od oko 10 000 L/kg uz upotrebu ribe od 1 g, s odgovarajućom brzinom apsorpcije od oko 500 L/kg/dan (u skladu s jednadžbom Sijm *et al* (46)).

▼M7

dva poluvijeka takvih tvari. U slučaju vrlo visoko bioakumulacijskih tvari moglo bi biti korisno produžiti fazu izlučivanja (ako se na to ukazuje u preliminarnom ispitivanju).

Ako se tvar izlučuje vrlo sporo tako da nije moguće utvrditi točno trajanje poluvijeka u fazi izlučivanja, informacije bi ipak mogle biti dostatne za potrebe procjene radi utvrđivanja je li riječ o visokoj razini bioakumulacije. Obratno, ako se tvar izlučuje toliko brzo da nije moguće odrediti pouzdanu koncentraciju u nultom vremenu (koncentraciju na kraju apsorpcije / početku izlučivanja, $C_{0,d}$) ni vrijednost k_2, moguće je konzervativno procijeniti vrijednost k_2 (vidjeti Dodatak 7.).

Ako iz analiza ribe u ranijim intervalima (npr. 7 ili 14 dana) proizlazi da je tvar izlučena ispod razina kvantifikacije prije isteka punog razdoblja od 28 dana, moguće je prekinuti naknadno uzorkovanje i ispitivanje.

U nekim je slučajevima na kraju razdoblja apsorpcije (ili u drugom uzorku izlučivanja) moglo doći do toga da nema mjerljive apsorpcije ispitivane tvari. Ako se može dokazati i. da su ispunjeni kriteriji valjanosti iz stavka 113. i ii. da do nedostatka apsorpcije nije došlo zbog nekih drugih nedostataka ispitivanja (npr. nedovoljno dugo trajanje apsorpcije, manjkavost tehnike dodavanja dodatka hrani što dovodi do slabe bioraspoloživosti, nedostatak osjetljivosti analitičke metode, ribe ne konzumiraju hranu itd.) moglo bi biti moguće prekinuti ispitivanje bez potrebe za njegovim ponavljanjem uz duže trajanje apsorpcije. Ako je preliminarnim radnjama utvrđeno da je to slučaj, preporučuje se provođenje analize izmeta, po mogućnosti, u pogledu neprobavljene ispitivane tvari, kao sastavni dio pristupa „bilance mase”.

Broj ispitnih riba

Slično kao u ispitivanju vodenim izlaganjem, trebalo bi odabirati ribe slične mase i dužine, pri čemu masa najmanje ribe mora iznositi barem dvije trećine mase najveće ribe (vidjeti stavke 40. do 42.).

Ukupan bi broj riba za ispitivanje trebalo odabirati na temelju rasporeda uzorkovanja (najmanje jedan uzorak na kraju faze apsorpcije i četiri do šest uzoraka tijekom faze izlučivanja, ovisno o trajanju faza), uzimajući u obzir osjetljivost analitičke tehnike, koncentraciju koja će vjerojatno biti postignuta na kraju faze apsorpcije (na temelju ranijih znanja) i trajanje izlučivanja (ako ga je moguće procijeniti na temelju ranijih saznanja). Pet do deset riba trebalo bi uzorkovati pri svakom uzorkovanju, pri čemu se parametri rasta (masa i ukupna dužina) mjere prije analize kemikalija ili lipida.

Zbog svojstvene varijabilnosti veličine, brzine rasta i fiziologije među ribama te vjerojatnih varijacija u količini osigurane hrane koju konzumira svaka riba, u svakom bi intervalu trebalo uzorkovati najmanje pet riba iz ispitne skupine i pet iz kontrolne skupine kako bi se pravilno utvrdila prosječna koncentracija i njezina varijabilnost. Varijabilnost među upotrijebljenim ribama vjerojatno će više pridonijeti ukupnoj nekontroliranoj varijabilnosti u ispitivanju nego varijabilnost svojstvena primijenjenim analitičkim metodologijama te je stoga u određenim slučajevima opravdana upotreba do deset riba po uzorku. Međutim, ako temeljne vrijednosti koncentracija ispitivane tvari u kontrolnim ribama nisu mjerljive na početku izlučivanja, mogla bi biti dovoljna samo kemijska analiza dviju ili triju kontrolnih riba u konačnom intervalu uzorkovanja ako se preostale kontrolne ribe na svim točkama uzorkovanja ipak uzorkuje u pogledu mase i ukupne dužine (tako da se u pogledu rasta uzorkuje jednak broj riba iz ispitnih i kontrolnih skupina). Ribe bi trebalo skladištiti, vagati pojedinačno (čak i ako se pokaže potrebnim naknadno spajanje rezultata uzorkovanja) i izmjeriti njihovu ukupnu dužinu.

▼M7

Kod standardnog ispitivanja, na primjer, s izlučivanjem u trajanju od 28 dana uključujući pet uzoraka uzetih tijekom izlučivanja, to znači ukupno 59 do 120 riba iz ispitnih i 50 do 110 riba iz kontrolnih skupina, pod pretpostavkom da se analitičkom tehnikom koja se primjenjuje na tvar omogućuje provođenje analize sadržaja lipida na istoj ribi. Ako nije moguće provesti analizu lipida na istoj ribi koja je upotrijebljena za kemijsku analizu, a nije izvediva ni upotreba kontrolne ribe samo za analizu lipida (vidjeti stavak 56.), potrebno je 15 dodatnih riba (tri iz matične populacije na početku ispitivanja, po tri iz kontrolne i ispitne skupine na početku izlučivanja i po tri iz kontrolne i ispitne skupine na kraju pokusa). Primjer rasporeda uzorkovanja s količinama riba dostupan je u Dodatku 4.

Punjenje

Trebalo bi primjenjivati slično visoke omjere vode i riba kao i kod metode vodenog izlaganja (vidjeti stavke 43. i 44.). Iako količina ribe koja se dodaje u vodu ne utječe na koncentracije pri izlaganju u ovome ispitivanju, preporučuje se gustoća punjenja od 0,1 do 1,0 g ribe (mokre mase) po litri vode dnevno radi održavanja odgovarajućih koncentracija otopljenog kisika i smanjenja stresa kod ispitnih organizama.

Ispitna hrana i hranjenje

Tijekom razdoblja aklimatizacije ribe bi trebalo hraniti odgovarajućom hranom kako je prethodno opisano (stavak 117.). Ako se ispitivanje provodi u protočnim uvjetima, protok bi trebalo zaustaviti dok se hrani ribe.

Tijekom ispitivanja hrana namijenjena ispitnoj skupini trebala bi biti u skladu s prethodnim opisom (stavci od 116. do 121.). Uz razmatranje čimbenika specifičnih za tvar, analitičku osjetljivost, očekivanu koncentraciju u hrani u okolišnim uvjetima i razine kronične toksičnosti / tjelesnog opterećenja, pri odabiru ciljane koncentracije dodatka hrani trebalo bi u obzir uzeti okus hrane (kako ribe ne bi izbjegavale hranu). Nazivnu koncentraciju ispitivane tvari koja je dodana hrani trebalo bi evidentirati u izvješću. Na temelju iskustva, koncentracijama dodatka hrani u rasponu od 1 do 1000 μg/g omogućuje se praktičan radni raspon za ispitivane tvari koje ne pokazuju određen toksični mehanizam. Kod tvari koje djeluju kroz nespecifični mehanizam razine ostataka u tkivu ne bi smjele biti više od 5 μmol/g lipida jer će ostaci iznad te razine vjerojatno imati kronične učinke (19., 48., 50.) ([1]). Kod drugih bi tvari trebalo voditi računa o tome da iz akumuliranog izlaganja ne proizađu nikakvi štetni učinci (vidjeti stavak 127.). To osobito vrijedi ako se istovremeno ispituje više od jedne tvari (vidjeti stavak 112.).

Odgovarajuća količina ispitivane tvari može se dodati hrani za ribe na jedan od tri načina, kako je navedeno u stavku 119. i Dodatku 7. Metode i postupke za dodavanje dodatka hrani trebalo bi evidentirati u izvješću. Neobrađenom hranom hrani se kontrolna riba, a ta hrana sadržava jednaku količinu uljnog nosača bez dodatka ako je on upotrijebljen u hrani s dodatkom za fazu apsorpcije, ili je obrađena „čistim” otapalom ako je otapalo nosač upotrijebljeno za pripremu hrane za ispitnu skupinu. Koncentracija ispitivane tvari u obrađenoj i neobrađenoj hrani mjeri se analitički barem tri puta prije početka faze apsorpcije i na njezinu kraju. Nakon izlaganja obrađenoj hrani (faza apsorpcije), ribu (obje skupine) se hrani neobrađenom hranom (faza izlučivanja).

Ribe se hrani fiksnim obrocima (ovisno o vrsti; na primjer, oko 1 do 2 % mokre tjelesne mase na dan u slučaju kalifornijske pastrve). Brzinu hranjenja trebalo bi određivati tako da se izbjegavaju brz rast i veliko povećanje sadržaja lipida. Trebalo bi evidentirati točnu brzinu hranjenja uspostavljenu tijekom pokusa. Inicijalnu količinu hrane trebalo bi temeljiti na planiranim mjerenjima mase matične populacije neposredno prije početka ispitivanja. Količinu hrane trebalo

([1]) Budući da je stvarne unutarnje koncentracije moguće utvrditi tek nakon provođenja ispitivanja, potrebno je procijeniti očekivanu unutarnju koncentraciju (npr. na temelju očekivane vrijednosti BMF-a i koncentracije u hrani; vidjeti jednadžbu A5.8 u Dodatku 5.).

▼M7

bi prilagoditi na temelju mokre mase uzorkovanih riba pri svakom uzorkovanju kako bi se uzeo u obzir rast tijekom pokusa. Mase i dužine riba u ispitnim i kontrolnim akvarijima moguće je procijeniti na temelju masa i ukupnih dužina riba upotrijebljenih pri svakom uzorkovanju; ne važe se ni ne mjeri preostale ribe u ispitnim i kontrolnim akvarijima. Važno je tijekom cijelog pokusa održavati istu utvrđenu brzinu hranjenja.

Hranjenje bi trebalo promatrati kako bi se osiguralo da ribe konzumiraju svu hranu koja im je dana i tako zajamčilo da se u izračunima upotrebljavaju odgovarajuće stope unosa hrane. Preliminarne pokuse hranjenja ili prethodno iskustvo treba uzeti u obzir pri odabiru brzine hranjenja kojom će se osigurati da se konzumira sva hrana iz hranjenja koje se provodi jednom dnevno. Ako hrana sustavno ostaje nekonzumirana, preporučuje se rasporediti dozu na dodatno razdoblje hranjenja u svakom pokusnom danu (npr. zamijeniti hranjenje jednom dnevno hranjenjem polovinom obroka dva puta dnevno). Ako je navedeno potrebno, drugo bi hranjenje trebalo provesti u utvrđeno vrijeme, i to tako da vremenski razmak do uzorkovanja riba bude najdulji mogući (npr. određuje se da se drugo hranjenje provede u prvoj polovini pokusnog dana).

Iako ribe uglavnom brzo konzumiraju hranu, važno je osigurati da tvar ostane adsorbirana u hrani. Treba nastojati izbjegavati odvajanje ispitivane tvari od hrane u vodi, čime bi se ribe istovremeno s izlaganjem kroz hranu izložilo i koncentracijama ispitivane tvari putem vode. To se može postići uklanjanjem sve nekonzumirane hrane (i izmeta) iz ispitnih i kontrolnih akvarija unutar jednog sata od hranjenja, ali po mogućnosti unutar 30 minuta. Nadalje, može se upotrijebiti sustav u kojem se vodu kontinuirano čisti s pomoću filtra s aktivnim ugljenom koji upija sve „otopljene” onečišćujuće tvari. Protočnim se sustavima može omogućiti brzo ispiranje čestica hrane i otopljenih tvari ([1]). U određenim se slučajevima neznatno izmijenjenom tehnikom pripreme hrane s dodatkom može pridonijeti ublažavanju tog problema (vidjeti stavak 119.).

Svjetlo i temperatura

Kao i u metodi vodenog izlaganja (vidjeti stavak 48.), za ispitnu vrstu koju se upotrebljava preporučuju se fotoperiod od 12 do 16 sati i odgovarajuća temperatura (± 2 °C) (vidjeti Dodatak 3.). Vrsta i značajke osvjetljenja trebaju biti poznati i evidentirani.

Kontrole

Trebalo bi upotrebljavati jednu kontrolnu skupinu u kojoj se ribe hrani jednakim obrocima kao u ispitnoj skupini, ali bez ispitivane tvari. Ako je za dodavanje dodatka hrani upotrijebljen uljni nosač ili nosač otapalo, kontrolnu bi skupinu trebalo tretirati na potpuno jednak način, ali bez ispitne tvari kako bi prehrana ispitne skupine i kontrolne skupine bila istovjetna (vidjeti stavke 121. i 139.).

([1]) Zbog izlučivanja riba ili ispiranja iz hrane možda neće biti moguće u potpunosti izbjeći prisutnost ispitivane tvari u ispitnom mediju. Stoga je jedna od mogućnosti mjerenje koncentracije tvari u vodi na kraju razdoblja apsorpcije, posebno ako se upotrebljava polustatički postav, kako bi se omogućilo utvrđivanje toga je li došlo do vodenog izlaganja.

▼M7

Učestalost mjerenja kvalitete vode

Primjenjuju se uvjeti jednaki onima iz metode vodenog izlaganja, osim što je ukupni organski ugljik potrebno mjeriti samo prije ispitivanja kao dio utvrđivanja obilježja ispitne vode (vidjeti stavak 53.).

Uzorkovanje i analiza riba i hrane

Analiza uzoraka hrane

Uzorke ispitne i kontrolne hrane analizira se najmanje tri puta u pogledu koncentracije ispitivane tvari i sadržaja lipida barem prije početka faze apsorpcije i na njezinu kraju. Metode analize i postupke kojima se osigurava homogenost prehrane trebalo bi uključiti u izvješće.

Uzorke bi trebalo analizirati u pogledu ispitivane tvari uspostavljenom i provjerenom metodom. Trebalo bi provesti radnje prije ispitivanja kojima se utvrđuju granica kvantifikacije, postotak izdvajanja ispitivane tvari, interferencije i analitička varijabilnost u planiranoj matrici uzorka. Ako se ispituje radioaktivno obilježen materijal, trebalo bi uzeti u obzir slična razmatranja kao ona u metodi vodenog izlaganja, pri čemu analiza hrane zamjenjuje analizu vode (vidjeti stavak 65.).

Analiza riba

Pri svakom uzorkovanju riba uzorkuje se pet do deset jedinki iz izloženih i kontrolnih skupina (u određenim slučajevima može se smanjiti broj kontrolnih riba; vidjeti stavak 134.).

Uzorkovanje bi trebalo provoditi u isto vrijeme svakog pokusnog dana (u odnosu na vrijeme hranjenja) te u trenutku u kojem je vjerojatnost da će hrana ostati u utrobi tijekom faze apsorpcije i početnog dijela faze izlučivanja svedena na minimum radi sprječavanja prividnih doprinosa ukupnim koncentracijama ispitivane tvari (odnosno, uzorkovane bi ribe trebalo ukloniti na kraju pokusnog dana, imajući na umu da pokusni dan počinje u trenutku hranjenja i završava u trenutku sljedećeg hranjenja, oko 24 sata kasnije. Izlučivanje počinje u trenutku prvog hranjenja hranom bez dodatka; vidjeti stavak 128.). Prvi je uzorak iz faze izlučivanja (uzet neposredno prije drugog hranjenja hranom bez dodatka) važan jer se metoda ekstrapolacije jedan dan unazad iz tog mjerenja upotrebljava za procjenu koncentracije u nultom vremenu ($C_{0,d}$, koncentracija u ribi na kraju apsorpcije / početku izlučivanja). Druga je mogućnost uklanjanje probavnog trakta ribe i zasebna analiza na kraju apsorpcije te tijekom prvog i trećeg dana izlučivanja.

Pri svakom uzorkovanju ribu je potrebno ukloniti iz obaju ispitnih posuda i tretirati na način koji je opisan za metodu vodenog izlaganja (vidjeti stavke od 61. do 63.).

Koncentracije ispitivane tvari u cijeloj ribi (mokra masa) mjere se barem na kraju faze apsorpcije i tijekom faze izlučivanja i u kontrolnim i u ispitnim skupinama. Tijekom faze izlučivanja preporučuje se četiri do šest točaka uzorkovanja (npr. prvi, treći, sedmi, četrnaesti i dvadeset osmi dan). Druga je mogućnost uključiti dodatnu točku uzorkovanja nakon jednog do tri dana apsorpcije radi procjene učinkovitosti asimilacije iz linearnog dijela apsorpcije kod ribe, a opet blizu početka razdoblja izlaganja. Postoje dva glavna odstupanja od rasporeda: i. ako se za potrebe istraživanja kinetike apsorpcije primjenjuje produljena faza apsorpcije, tijekom faze apsorpcije dodaju se dodatne točke uzorkovanja te će biti potrebno uključiti još riba (vidjeti stavak 126.); ii. ako je ispitivanje prekinuto

▼M7

na kraju faze apsorpcije zbog izostanka mjerljive apsorpcije (vidjeti stavak 131.). Pojedinačne ribe koje se uzorkuje trebalo bi izvagati (i izmjeriti njihovu ukupnu dužinu) kako bi se omogućilo utvrđivanje konstanti brzine rasta. Koncentracije tvari u određenom tkivu riba (jestivi i nejestivi dijelovi) isto se tako može mjeriti na kraju apsorpcije i u odabranim trenucima tijekom izlučivanja. Ako se ispituje radioaktivno obilježen materijal, trebalo bi uzeti u obzir slična razmatranja kao ona u metodi vodenog izlaganja, pri čemu analiza hrane zamjenjuje analizu vode (vidjeti stavak 65.).

Kod povremene upotrebe referentne tvari (vidjeti stavak 25.) koncentracije bi, prema mogućnosti, trebalo mjeriti u ispitnoj skupini na kraju apsorpcije i pri svim vremenima tijekom izlučivanja navedenima za ispitivanu tvar (cijela riba); koncentracije u kontrolnoj skupini potrebno je analizirati samo na kraju apsorpcije (cijela riba). U određenim okolnostima (na primjer ako analitičke tehnike za ispitivanu tvar i referentnu tvar nisu spojive pa bi za praćenje rasporeda uzorkovanja bilo potrebno još riba) moguće je primijeniti još jedan pristup, kako slijedi, kako bi se potrebna količina dodatnih riba svela na najnižu mjeru. Koncentracije referentne tvari mjere se tijekom izlučivanja samo prvog i trećeg dana i na dvije dodatne točke uzorkovanja odabrane tako da je moguće pouzdano procijeniti koncentraciju u nultom vremenu ($C_{0,d}$) i vrijednost k_2 za referentnu tvar.

Ako je moguće, sadržaj lipida u pojedinačnim ribama trebalo bi utvrditi pri svakom uzorkovanju ili barem na početku i kraju faze apsorpcije te na kraju faze izlučivanja. (vidjeti stavke 56. i 67.). Ovisno o analitičkoj metodi (vidjeti stavak 67. i Dodatak 4.) moglo bi biti moguće upotrijebiti istu ribu za utvrđivanje sadržaja lipida i koncentracije ispitivane tvari. To je bolja mogućnost jer se njome smanjuje broj riba. Međutim, ako to nije moguće, može se primijeniti pristup koji je opisan u metodi vodenog izlaganja (te su druge mogućnosti mjerenja lipida navedene u stavku 56.). Metodu upotrijebljenu za kvantificiranje sadržaja lipida evidentira se u izvješću.

Kvaliteta analitičke metode

Trebalo bi provesti provjere s pomoću pokusa kako bi se jamčila specifičnost, točnost, preciznost i obnovljivost analitičke tehnike specifične za tvar, kao i izdvajanje ispitivane tvari iz hrane i ribe.

Mjerenje rasta riba

Na početku ispitivanja potrebno je izvagati uzorak riba iz matične populacije (i izmjeriti njihovu ukupnu dužinu). Te bi ribe trebalo uzorkovati neposredno prije prvog hranjenja hranom s dodatkom (npr. jedan sat) i pripisati ih nultom pokusnom danu. Broj riba u tom uzorku trebao bi biti barem jednak broju riba namijenjenih uzorkovanju tijekom ispitivanja. Neke od njih mogu biti iste ribe kao one upotrijebljene za analizu lipida prije početka faze apsorpcije (vidjeti stavak 153.). U svakom intervalu uzorkovanja ribe se prvo važe i mjeri se njihova dužina. Kod svake pojedinačne ribe izmjerenu masu (i dužinu) trebalo bi povezati s koncentracijom analizirane kemikalije (i, prema potrebi, sadržajem lipida), na primjer upotrebom koda jedinstvenog identifikatora za svaku uzorkovanu ribu. Mjerenjem tih uzorkovanih riba moguće je procijeniti masu (i dužinu) riba preostalih u ispitnom i kontrolnom akvariju.

Ocjena pokusa

Trebalo bi svakodnevno pratiti smrtnost i evidentirati je. Trebalo bi dodatno promatrati štetne učinke, na primjer neuobičajeno ponašanje ili pigmentaciju, te ih evidentirati. Ribe se smatra uginulima ako se opaža da nema pokreta disanja i da ne reagiraju na blage mehaničke podražaje. Potrebno je ukloniti sve uginule ribe i ribe za koje je očito da su na umoru.

▼M7

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Rezultate ispitivanja upotrebljava se za određivanje konstante brzine izlučivanja (k_2) kao funkcije ukupne mokre mase ribe. Konstanta brzine rasta, k_g, temeljena na prosječnom povećanju mase riba izračunava se i upotrebljava za određivanje konstante brzine izlučivanja ispravljene u odnosu na rast, k_{2g}, prema potrebi. Nadalje, potrebno je izvijestiti o učinkovitosti asimilacije (a; apsorpcija iz utrobe), kinetičkom faktoru biomagnifikacije (BMF_K) (prema potrebi ispravljen u odnosu na rast, BMF_{Kg}), njegovoj vrijednosti ispravljenoj u odnosu na lipide (BMF_{KL} ili BMF_{KgL}, ako je ispravljeno u odnosu na razrjeđenje zbog rasta) i brzini hranjenja. Isto tako, ako je moguće procijeniti vrijeme potrebno do postizanja stabilnog stanja u fazi apsorpcije (npr. 95 % stabilnog stanja ili $t_{95} = 3{,}0/k_2$), može se uključiti procjena vrijednosti BMF-a u stabilnom stanju (BMF_{SS}) (vidjeti stavke 105. i 106. te Dodatak 5.) ako je iz vrijednosti t_{95} vidljivo da je stabilno stanje možda postignuto. Na tu bi vrijednost BMF_{SS} trebalo primijeniti isti ispravak u odnosu na lipide kao i na kinetički dobivenu vrijednost BMF-a (BMF_K) da bi se dobila vrijednost ispravljena u odnosu na lipide, BMF_{SSL} (važno je napomenuti da nije dogovoren postupak za ispravljanje vrijednosti BMF-a u stabilnom stanju u odnosu na razrjeđenje zbog rasta). Formule i primjeri izračuna navedeni su u Dodatku 7. Dostupni su pristupi zahvaljujući kojima je izvediva procjena kinetičkog faktora biokoncentracije (BCF_K) na temelju podataka dobivenih iz ispitivanja kroz hranu. O tome se govori u Dodatku 8.

Podaci o masi/dužini riba

Mokre mase i dužine pojedinačnih riba u svim razdobljima izračunavaju se odvojeno za ispitne i kontrolne skupine za sve dane uzorkovanja tijekom faze apsorpcije (matična populacija na početku apsorpcije; kontrolna skupina i ispitna skupina na kraju apsorpcije i, ako se provodi, u ranoj fazi (npr. prva tri dana apsorpcije) i fazi izlučivanja (npr. prvi, drugi, četvrti, sedmi, četrnaesti i dvadeset osmi dan, za kontrolnu i za ispitnu skupinu). Masa je najvažnija mjera rasta za potrebe ispravljanja u odnosu na rast. Metoda (metode) za ispravljanje podataka u odnosu na razrjeđenje zbog rasta navedene su u nastavku (stavci 162. i 163.) i u Dodatku 5.

Podaci o koncentraciji ispitivane tvari u ribama

Količine ostataka ispitivane tvari u pojedinačnim ribama (ili skupnim uzorcima riba ako nije moguće mjerenje pojedinačnih riba), izražene kao koncentracija u mokroj masi, iskazuju se za ispitne i kontrolne ribe u pojedinačnim vremenima uzorkovanja. Ako je na svakoj uzorkovanoj ribi provedena analiza lipida, moguće je odrediti i iskazati pojedinačne koncentracije ispravljene u odnosu na lipide, kao koncentraciju lipida (lipidi u mokroj masi).

— Količine ostataka ispitivane tvari u pojedinačnim ribama (ili skupnim uzorcima riba ako nije moguće mjerenje pojedinačnih riba, vidjeti stavak 66.) za razdoblje izlučivanja preračunavaju se u njihove prirodne logaritme i grafički prikazuju u odnosu na vrijeme (dan). Ako se vizualnom inspekcijom tog grafičkog prikaza utvrde očite netipične vrijednosti, može se primijeniti statistički valjano ispitivanje netipičnih vrijednosti radi uklanjanja prividnih podatkovnih točaka te dokumentirati opravdanje za njihovo izostavljanje.

— Linearna korelacija u skladu s metodom najmanjih kvadrata izračunava se za podatke ln(koncentracija) u odnosu na izlučivanje (dan). Nagib i odsječak pravca navode se kao konstanta ukupne brzine izlučivanja (k_2) i prirodni logaritam dobivene koncentracije u nultom vremenu ($C_{0,d}$) (dodatne pojedinosti dostupne su u Dodatku 5. i Dodatku 7.). Ako to nije moguće jer su koncentracije niže od granice kvantifikacije za drugi uzorak pri izlučivanju, moguće je konzervativno procijeniti vrijednost k_2 (vidjeti Dodatak 7.).

— Varijance u nagibu i odsječku pravca izračunavaju se primjenom standardnih statističkih postupaka te se za te rezultate ocjenjuju i iznose intervali pouzdanosti od 90 % (ili 95 %).

▼M7

— Srednja koncentracija izmjerena u ribama za posljednji dan apsorpcije (izmjerena koncentracija u nultom vremenu, $C_{0,m}$) isto se tako izračunava i uspoređuje s dobivenom vrijednošću $C_{0,d}$. Ako je dobivena vrijednost niža od izmjerene vrijednosti, ta razlika može ukazati na prisutnost neprobavljene hrane s dodatkom u utrobi. Ako je dobivena vrijednost mnogo viša od izmjerene vrijednosti, to može ukazivati na činjenicu da je vrijednost dobivena iz linearne regresije podataka o izlučivanju pogrešna i da ju je potrebno ponovno procijeniti (vidjeti Dodatak 7.).

Brzina izlučivanja i faktor biomagnifikacije

Kako bi se mogao izračunati faktor biomagnifikacije iz podataka, prvo je potrebno odrediti učinkovitost asimilacije (apsorpcija ispitivane tvari u cijeloj utrobi, α). Za to bi trebalo upotrijebiti jednadžbu A7.1 iz Dodatka 7., pri čemu je potrebno poznavati dobivenu koncentraciju u ribama u nultom vremenu u fazi izlučivanja ($C_{0,d}$), (ukupnu) konstantu brzine izlučivanja (k_2), koncentraciju u hrani (C_{food}), konstantu brzine konzumiranja hrane (I) i trajanje razdoblja apsorpcije (t). Nagib i odsječak linearne veze između ln(koncentracija) i vremena izlučivanja navodi se kao konstanta ukupne brzine izlučivanja (k_2 = nagib) i koncentracije u nultom vremenu ($C_{0,d} = e^{intercept}$), kako je prethodno navedeno. Dobivene bi vrijednosti trebalo provjeriti u pogledu biološke vjerodostojnosti (npr. učinkovitost asimilacije izražena kao razlomak ne može biti viša od 1). Vrijednost *(I)* izračunava se dijeljenjem mase hrane s masom riba koje se hrani svakodnevno (ako ih se hrani u ekvivalentu 2 % tjelesne mase, vrijednost *(I)* iznosit će 0,02). Međutim, brzinu hranjenja primijenjenu u izračunu možda će trebati prilagoditi u odnosu na rast riba (to se može učiniti upotrebom poznate konstante brzine rasta radi procjene mase riba u svakoj vremenskoj točki u fazi apsorpcije; vidjeti Dodatak 7.). Ako se vrijednosti k_2 i $C_{0,d}$ ne mogu dobiti jer su se, na primjer, koncentracije spustile ispod granice detekcije za drugi uzorak pri izlučivanju, moguće je konzervativno procijeniti vrijednost k_2 i gornje granice vrijednosti BMF_k (vidjeti Dodatak 7.).

Kad se odredi učinkovitost asimilacije (α), faktor biomagnifikacije može se izračunati množenjem vrijednosti α s konstantom brzine konzumacije (I) i dijeljenjem s (ukupnom) konstantom brzine izlučivanja (k_2). Na isti se način izračunava i faktor biomagnifikacije ispravljen u odnosu na rast, ali se primjenjuje konstanta brzine izlučivanja ispravljena u odnosu na rast (k_{2g}; vidjeti stavke 162. i 163.). Alternativna se procjena učinkovitosti asimilacije može dobiti ako je analiza tkiva provedena na ribama uzorkovanima u ranoj, linearnoj fazi faze apsorpcije; vidjeti stavak 151. i Dodatak 7. Ta vrijednost predstavlja neovisnu procjenu učinkovitosti asimilacije za uglavnom neizložen organizam (odnosno ribe su blizu početku faze apsorpcije). Za određivanje vrijednosti BMF-a uobičajeno se upotrebljava učinkovitost asimilacije procijenjena iz podataka o izlučivanju.

Ispravljanje u odnosu na lipide i ispravljanje u odnosu na razrjeđenje koje nastaje zbog rasta

Zbog rasta riba tijekom faze izlučivanja može doći do snižavanja koncentracija mjerene kemikalije u ribama što za posljedicu ima povećanje konstante brzine izlučivanja, k_2, veće od onog do kojeg bi došlo samo u postupcima uklanjanja (npr. metaboliziranje, izlučivanje) (vidjeti stavak 72.). Sadržaji lipida u ispitnim ribama (koji su usko povezani s bioakumulacijom hidrofobnih tvari) i sadržaji lipida u hrani u praksi se mogu razlikovati dovoljno da bude potrebno ispraviti ih kako bi bilo moguće predstaviti faktore biomagnifikacije na smislen način. Faktor biomagnifikacije trebalo bi ispraviti u odnosu na rast (kao što se to čini s kinetičkim BCF-om u metodi vodenog izlaganja) i u odnosu na sadržaj lipida u hrani u odnosu na njihov sadržaj u ribama (faktor ispravka u odnosu na lipide). Jednadžbe i primjeri za te izračune dostupni su u Dodatku 5. odnosno Dodatku 7.

Kod ispravljanja u odnosu na razrjeđenje zbog rasta trebalo bi izračunati konstantu brzine rasta ispravljenu u odnosu na rast (k_{2g}) (jednadžbe su dostupne u Dodatku 5.). Tu se konstantu brzine izlučivanja ispravljenu u odnosu na rast (k_{2g}) zatim upotrebljava za izračun faktora biomagnifikacije ispravljenog u odnosu na rast, kao u stavku 73. U nekim slučajevima taj pristup nije moguć. U drugom se pristupu, kojim se zaobilazi potreba za ispravljanjem u odnosu na razrjeđenje zbog rasta, upotrebljavaju podaci o masi izlučivanja ispitivane tvari

▼M7

po ribi (na temelju cijele ribe), a ne uobičajeni podaci o masi ispitivane tvari po jediničnoj masi ribe (koncentracija). To je lako postići jer bi se u okviru ispitivanja u skladu s ovom metodom trebale povezivati zabilježene koncentracije u tkivu s masama pojedinačnih riba. Jednostavan postupak za to opisan je u Dodatku 5. Važno je napomenuti da bi vrijednost k_2 trebalo procijeniti i o njoj izvijestiti čak i ako se upotrebljava ovaj alternativni pristup.

Kako bi bilo moguće ispravljanje u odnosu na sadržaj lipida u hrani i ribi ako nije provedena analiza na svim uzorkovanim ribama, određuju se prosječni udjeli lipida (mokra masa) u ribi i hrani ([1]). Faktor ispravljenih lipida (L_c) tada se izračunava dijeljenjem prosječnog udjela lipida u ribi s prosječnim udjelom lipida u hrani. Faktor biomagnifikacije, prema potrebi ispravljen u odnosu na rast, dijeli se s faktorom ispravljenih lipida radi izračunavanja faktora biomagnifikacije ispravljenog u odnosu na lipide.

Ako su na istoj ribi pri svakoj točki uzorkovanja provedene kemijske analize i analize lipida, moguće je upotrijebiti podatke o tkivu pojedine ribe ispravljene u odnosu na lipide kako bi se izravno izračunala vrijednost BMF-a ispravljena u odnosu na lipide (vidjeti 37.). Iz grafičkog prikaza podataka o koncentraciji ispravljenih u odnosu na lipide dobiva se vrijednost $C_{0,d}$ na temelju lipida i k_2. Tada se može nastaviti s matematičkom analizom upotrebljavajući iste jednadžbe iz Dodatka 7., ali se učinkovitost asimilacije (a) izračunava upotrebom konstante brzine konzumiranja hrane ispravljene u odnosu na lipide (I_{lipid}) i koncentracije u hrani na temelju lipida ($C_{\text{food-lipid}}$). Parametri ispravljeni u odnosu na lipide na sličan se način tada mogu upotrijebiti za izračun vrijednosti BMF-a (ispravljanje konstante brzine rasta trebalo bi primijeniti i na udio lipida umjesto na mokru masu ribe pri izračunu vrijednosti BMF_{KgL} ispravljene u odnosu na lipide i na rast).

Tumačenje rezultata

Prosječan se rast u ispitnim i kontrolnim skupinama u načelu ne bi trebao znatno razlikovati kako bi se isključili toksični učinci. Konstante brzine rasta ili krivulje rasta tih dviju skupina trebalo bi usporediti s pomoću odgovarajućeg postupka ([2])).

Izvješće o ispitivanju

Nakon završetka ispitivanja priprema se konačno izvješće koje sadržava informacije o *ispitivanoj tvari*, *ispitnoj vrsti* i *uvjetima ispitivanja* kako su navedeni u stavku 81. (kao i u metodi vodenog izlaganja). Nadalje, potrebne su informacije u nastavku.

Kad je riječ o ispitivanoj tvari:

— sve informacije o stabilnosti ispitivane tvari u pripremljenoj hrani.

([1]) Taj je pristup specifičan za ispitivanje kroz hranu, a razlikuje se od postupka koji se primjenjuje u vodenom izlaganju te je zato radi izbjegavanja zabune upotrijebljen izraz „ispravljanje”, a ne „normiranje”, vidjeti i bilješku u stavku 106.

([2]) Na konstantama brzine rasta moguće je izvršiti t-test kako bi se ispitalo razlikuje li se rast između kontrolnih i ispitnih skupina, odnosno F-test u slučaju analize varijance. Prema potrebi, moguće je upotrijebiti F-test ili test omjera vjerojatnosti radi lakšeg odabiranja odgovarajućeg modela rasta (Monografija OECD-a br. 54, literatura (32.)).

▼M7

Kad je riječ o ispitnim uvjetima:

— nazivna koncentracija tvari u hrani, tehnika dodavanja dodatka hrani (*spiking*), količina nosača (lipida) upotrijebljenog u postupku dodavanja dodatka hrani (ako je upotrijebljen), koncentracije ispitivane tvari u hrani s dodatkom za svaku analizu (barem tri puta prije početka ispitivanja i na kraju apsorpcije) i prosječne vrijednosti,

— vrsta i kvaliteta uljnog nosača ili otapala (čistoća, dobavljač itd.) upotrijebljenog za dodavanje dodatka hrani, ako ga se upotrebljava,

— vrsta hrane koja se upotrebljava (približna analiza [1]), čistoća ili kvaliteta, dobavljač itd.), brzina hranjenja tijekom faze apsorpcije, količina hrane dane ribama i učestalost hranjenja (uključiti sve prilagodbe na temelju mase uzorkovanih riba),

— vrijeme u kojem su ribe sakupljene i eutanazirane radi kemijske analize za svaku točku uzorkovanja (npr. jedan sat prije hranjenja sljedećeg dana).

Kad je riječ o rezultatima:

— rezultati svih preliminarnih istraživanja,

— informacije o svim uočenim štetnim učincima,

— potpun opis svih primijenjenih postupaka kemijske analize, uključujući granice detekcije i kvantifikacije, varijabilnosti i izdvajanja,

— izmjerene koncentracije lipida u hrani (hrana s dodatkom i kontrolna hrana), pojedinačne, prosječne vrijednosti i standardne devijacije,

— izračunani podaci o masi (i dužini) pojedinačnih riba, za kontrolne i izložene skupine (na primjer upotrebom jedinstvenih identifikatora za svaku ribu) i izračuni, dobivena konstanta (konstante) brzine rasta i interval (intervali) pouzdanosti od 95 %,

— izračunani podaci o koncentraciji ispitivane tvari u ribama, prosječna izmjerena koncentracija na kraju apsorpcije ($C_{0,m}$) i dobivena (ukupna) konstanta brzine izlučivanja (k_2) te koncentracija u ribama na početku faze izlučivanja ($C_{0,d}$) zajedno s varijancama tih vrijednosti (nagib i odsječak),

— izračunani podaci o sadržaju lipida u ribama (navedeni u odnosu na koncentracije određene tvari, prema potrebi), prosječne vrijednosti za ispitnu i kontrolnu skupinu na početku ispitivanja, kraju apsorpcije i kraju izlučivanja,

— krivulje (uključujući sve izmjerene podatke) kojima se prikazuje sljedeće (koncentracije je prema potrebi moguće izraziti u odnosu na cijelo tijelo ili određena tkiva te životinje):

  — rast (odnosno masa (i dužina) ribe u odnosu na vrijeme) ili prirodni logaritam mase u odnosu na vrijeme,

[1] Tehnika analize hrane u pogledu sadržaja proteina, lipida, sirovih vlakana i pepela; te je informacije uobičajeno moguće dobiti od dobavljača hrane.

▼M7

— izlučivanje ispitivane tvari u ribi i

— prirodni logaritam koncentracije (ln koncentracija) u odnosu na vrijeme izlučivanja (uključujući dobivenu konstantu brzine izlučivanja k_2 i koncentraciju u ribama izvedenu iz prirodnog logaritma na početku faze izlučivanja, $C_{0,d}$),

— ako se vizualnom inspekcijom grafičkog prikaza utvrde očite netipične vrijednosti, može se primijeniti statistički valjano ispitivanje netipičnih vrijednosti radi uklanjanja prividnih podatkovnih točaka te dokumentirati opravdanje za njihovo izostavljanje,

— izračunana konstanta brzine izlučivanja ispravljena u odnosu na rast i izračunani poluvijek ispravljen odnosu na rast,

— izračunana učinkovitost asimilacije (α),

— „sirovi” BMF iz pristupa kroz hranu, kinetički BMF ispravljen u odnosu na lipide i rast („sirova” vrijednost i vrijednost ispravljena u odnosu na lipide na temelju mokre mase cijele ribe), BMF specifičan za tkivo, prema potrebi,

— sve informacije koje se odnose na metabolite radioaktivno obilježene ispitivane tvari i njihovu akumulaciju,

— sve posebnosti ispitivanja, moguća odstupanja od ovih postupaka i sve druge relevantne informacije,

— sažeta tablica relevantnih izmjerenih i izračunanih podataka, poput sljedeće:

Konstante brzine izlučivanja tvari i faktori biomagnifikacije (BMF_K)	
k_g (konstanta brzine rasta; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
k_2 (konstanta stope ukupnog izlučivanja; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI)
k_{2g} (konstanta stope izlučivanja ispravljena u odnosu na rast; dan^{-1}):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (izmjerena koncentracija u nultom vremenu, koncentracija u ribama na kraju apsorpcije) (μg/g):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
$C_{0,d}$ (dobivena koncentracija u nultom vremenu u fazi izlučivanja; μg/g):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
I (određena brzina konzumacije hrane; g hrane/g ribe/dan):	Unijeti vrijednost
I_g (stvarna brzina hranjenja, prilagođena u odnosu na rast; g hrane/g ribe/dan) (2):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
C_{food} (koncentracija kemikalije u hrani; μg/g):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
α (učinkovitost asimilacije u hrani):	Unijeti vrijednost ± SD (2)
BMF_K (kinetički BMF kroz hranu):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)
BMF_{Kg} (kinetički BMF kroz hranu, ispravljen u odnosu na rast):	Unijeti vrijednost (95 % CI) (1)

▼M7

Konstante brzine izlučivanja tvari i faktori biomagnifikacije (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (poluvijek u danima ispravljen u odnosu na rast):	Unijeti vrijednost ± SD ([2])
Lc (faktor ispravljenih lipida):	Unijeti vrijednost
BMF_{KgL} (kinetički BMF ispravljen u odnosu na lipide i na rast):	Unijeti vrijednost
BMF_{SS-L} (indikativni BMF u stabilnom stanju, ispravljen u odnosu na lipide) ([2]):	Unijeti vrijednost ± SD ([2])

([1]) CI: interval pouzdanosti (ako ga je moguće procijeniti)
([2]) SD: standardna devijacija (ako ju je moguće procijeniti)

LITERATURA

1. Poglavlje C.13 ovog Priloga, *Biokoncentracija: Test s ribama u protočnom postupku*.

2. Poglavlje A.6 ovog Priloga, *Topljivost u vodi.*

3. Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035.

4. Poglavlje A.8 ovog Priloga*, Podjelni koeficijent (n-oktanol-voda): Metoda protresanjem u tikvici.*

5. Poglavlje A.24 ovog Priloga*, Podjelni koeficijent (n-oktanol-voda), metoda HPLC.*

6. Poglavlje A.23 ovog Priloga*, Podjelni koeficijent (1-oktanol-voda): Metoda sporog miješanja.*

7. Poglavlje C.7 ovog Priloga*, Hidroliza kao funkcija pH.*

8. (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

9. Poglavlje A.5 ovog Priloga*, Površinska napetost vodenih otopina.*

10. Poglavlje A.4 ovog Priloga*, Tlak pare.*

11. Poglavlje C.4 ovog Priloga*, Laka biorazgradivost.*

12. Poglavlje C.29 ovog Priloga*, Laka biorazgradivost – CO_2 u začepljenim posudama.*

13. Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

14. Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

15. OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Dostupno na: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

16. Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

17. Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

18. Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

19. Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

20. Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

21. Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. objavljeno: 3. travnja 2012.

22. Poglavlje C.47 ovog Priloga, *Test toksičnosti na ribama u ranom životnom stadiju.*

23. Poglavlje C.15 ovog Priloga, *Test kratkotrajne toksičnosti na ribama u stadiju embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom.*

24. Poglavlje C.14 ovog Priloga, *Test rasta juvenilnih riba.*

25. OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

26. US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

27. US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

28. US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

29. Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

30. Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

31. Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

32. OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼**M7**

33. Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

34. Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

35. Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

36. Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

37. Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

38. Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

39. Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

40. Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

41. Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

42. Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

43. Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

44. Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

45. Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

46. Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

47. Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

48. McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

49. Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

50. McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

51. OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE I JEDINICE

Učinkovitost asimilacije (α) mjera je relativne količine tvari koja se iz utrobe apsorbira u organizam (α je bezdimenzionalan, ali se češće izražava kao postotak nego razlomak).

Bioakumulacija se uglavnom odnosi na proces u kojem koncentracija tvari u organizmu postiže razinu višu od one u respiratornom mediju (npr. u vodi ako je riječ o ribama ili u zraku ako je riječ o sisavcima), u hrani, ili u jednom i drugom (1).

Biokoncentracija je povećanje koncentracije ispitivane tvari u ili na organizmu (ili određenim tkivima organizma) u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u okolnom mediju.

Faktor biokoncentracije (BCF ili K_B) u bilo kojem trenutku u fazi apsorpcije ovog akumulacijskog testa koncentracija je ispitivane tvari u/na ribi odnosno njezinim određenim tkivima (C_f u mg/kg) podijeljena s koncentracijom tvari u okolnom mediju (C_w u mg/l). BCF se izražava u $l \cdot kg^{-1}$. Potrebno je napomenuti da se ne uzimaju u obzir korekcije zbog rasta i/ili standardnog sadržaja lipida.

Biomagnifikacija je povećanje koncentracije ispitivane tvari u ili na organizmu (ili određenim tkivima organizma) u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u hrani.

Faktor biomagnifikacije (BMF) koncentracija je tvari u grabežljivcu u odnosu na koncentraciju u njegovu plijenu (ili hrani) u stabilnom stanju. U metodi koja se opisuje u ovoj ispitnoj metodi pažljivo se izbjegava izlaganje kroz vodenu fazu te se stoga vrijednost BMF-a iz ove ispitne metode ne može izravno usporediti s vrijednošću BMF-a iz terenskih ispitivanja (u kojima je moguće kombinirati vodeno izlaganje i izlaganje kroz hranu).

Faktor biomagnifikacije kroz hranu (BMF kroz hranu) izraz je kojim se u ovoj ispitnoj metodi opisuje rezultat ispitivanja izlaganja kroz hranu u kojemu se pažljivo izbjegava izlaganje kroz vodenu fazu te se stoga BMF kroz hranu iz ove ispitne metode ne može izravno usporediti s vrijednošću BMF-a iz terenskih ispitivanja (u kojima je moguće kombinirati vodeno izlaganje i izlaganje kroz hranu).

Faza nakon izlaganja ili faza izlučivanja (gubitka) vrijeme je nakon prijenosa ispitne ribe iz medija koji sadržava ispitivanu tvar u medij bez te tvari, tijekom kojega se proučava izlučivanje (odnosno neto gubitak) tvari iz ispitne ribe (odnosno njezina određenog tkiva).

Konstanta brzine izlučivanja (gubitka) (k_2) brojčana je vrijednost kojom se definira brzina smanjivanja koncentracije ispitivane tvari u ispitnoj ribi (odnosno njezinim određenim tkivima) nakon prijenosa ispitne ribe iz medija koji sadržava ispitivanu tvar u medij bez te tvari (k_2 se iskazuje u dan^{-1}).

Otopljeni organski ugljik (DOC) mjera je koncentracije ugljika podrijetlom iz otopljenih organskih izvora u ispitnom mediju.

Faza izlaganja ili apsorpcije vrijeme je u kojemu su ribe izložene ispitivanoj tvari.

Brzina konzumacije hrane (I) prosječna je količina hrane koju dnevno pojede svaka riba, u odnosu na procijenjenu prosječnu masu ribe (iskazuje se kao g hrane/g ribe/dan).

▼M7

Kinetički faktor biokoncentracije (BCF_K) omjer je konstante brzine apsorpcije, k_1, i konstante brzine izlučivanja, k_2 (tj. k_1/k_2 – vidjeti odgovarajuće definicije u ovom Dodatku). U načelu bi ta vrijednost trebala biti usporediva s vrijednošću BCF_{SS} (vidjeti prethodnu definiciju), pri čemu su moguća odstupanja ako nije bilo sigurno je li postignuto stabilno stanje ili ako su na kinetički BCF primijenjene korekcije zbog rasta.

Kinetički faktor biokoncentracije normiran na sadržaj lipida (BCF_{KL}) normiran je na ribu sa sadržajem lipida od 5 %.

Kinetički faktor biokoncentracije normiran na sadržaj lipida i ispravljen u odnosu na rast (BCF_{KgL}) normiran je na ribu sa sadržajem lipida od 5 % i ispravljen u odnosu na rast tijekom ispitivanja kako je opisano u Dodatku 5.

Faktor koncentracije u stabilnom stanju normiran na sadržaj lipida (BCF_{SSL}) normiran je na ribu sa sadržajem lipida od 5 %.

Tvar s više sastojaka se za potrebe REACH-a definira kao tvar u kojoj je više od jednog osnovnog sastojka prisutno u koncentraciji između 10 % i 80 % (mokra masa).

Podjelni koeficijent oktanol-voda (K_{OW}) omjer je topljivosti tvari u *n*-oktanolu i u vodi u ravnotežnom stanju (metode A.8. (2), A.24. (3), A.23. (4)); izražava se i kao P_{OW}. Logaritam od K_{OW} upotrebljava se kao pokazatelj potencijala biokoncentracije tvari u vodenim organizmima.

Suspendirani organski ugljik (POC – *particulate organic carbon*) mjera je koncentracije ugljika podrijetlom iz suspendiranih organskih izvora u ispitnom mediju.

Mikroekstrakcije iz krute faze (SPME) analitička je tehnika bez otapala razvijena za razrijeđene sustave. U ovoj se metodi vlakno obloženo polimerom izlaže plinovitoj ili tekućoj fazi koja sadržava analit koji se želi istražiti. Općenito se utvrđuje minimalno trajanje analize tako da se uspostave uvjeti ravnoteže između krute i tekuće faze, ovisno o vrstama koje se ispituju. Potom se koncentracija analita koji se želi istražiti može odrediti izravno iz vlakna ili nakon što ga se ekstrahira iz vlakna u otapalo, ovisno o tehnici određivanja.

Na grafičkom prikazu ispitivane tvari u ribi (C_f) u ovisnosti o vremenu smatra se da je stabilno stanje postignuto kad krivulja postane paralelna s vremenskom osi i kad se tri uzastopne analize C_f na uzorcima uzetima u razmacima od najmanje dva dana razlikuju za najviše ±20 % i kad nema znatnog povećanja vrijednosti C_f između prve i posljednje uzastopne analize. Kad se analiziraju objedinjeni uzorci, potrebne su najmanje četiri uzastopne analize. Kod ispitivanih tvari koje se sporo apsorbiraju, prikladniji su razmaci od sedam dana.

Faktor biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}) ne mijenja se znatno u dužem vremenskom razdoblju, a koncentracija ispitivane tvari u okolnom mediju za to vrijeme ostaje stalna (vidjeti definiciju stabilnog stanja).

Ukupni organski ugljik (TOC) mjera je koncentracije ugljika podrijetlom iz svih organskih izvora u ispitnom mediju, uključujući suspendirane i otopljene izvore.

Konstanta brzine apsorpcije (k_1) brojčana je vrijednost kojom se definira brzina povećanja koncentracije ispitivane tvari u/na ispitnoj ribi (odnosno njezinim određenim tkivima) kada se riba izlaže toj tvari (k_1 se iskazuje u $l\ kg^{-1}\ dan^{-1}$).

Za tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složene reakcijske proizvode i biološke materijale upotrebljava se pokrata UVCB.

▼**M7**

Kemikalija je tvar ili smjesa.

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

LITERATURA

1. Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624. – 637

2. Poglavlje A.8. ovog Priloga, *Podjelni koeficijent (n-oktanol-voda): Metoda protresanjem u tikvici.*

3. Poglavlje A.24. ovog Priloga, *Podjelni koeficijent (n-oktanol-voda), metoda HPLC*.

4. Poglavlje A.23. ovog Priloga, *Podjelni koeficijent (1-oktanol-voda): Metoda sporog miješanja*.

▼M7

Dodatak 2.

ODREĐENA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Sastavni dio	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatak 3.

PREPORUČENE RIBLJE VRSTE ZA ISPITIVANJE

Preporučene vrste	Preporučeni raspon temperature tijekom ispitivanja (°C)	Preporučena ukupna duljina ispitne životinje (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) zebrica	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (Rafinesque) debeloglava gavčica	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (Linnaeus) šaran	20 – 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (*Teleostei*, *Poeciliidae*) (Temminck i Schlegel) medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei*, *Poeciliidae*) (Peters) lepezasti gupi	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei Centrarchidae*) (Rafinesque) plavoškrga sunčanica	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (*Teleostei Salmonidae*) (Walbaum) kalifornijska pastrva	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (*Teleostei*, (*Gasterosteidae*) (Linnaeus) bodljikava koljuška	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Potrebno je napomenuti da je u samom testu poželjno upotrebljavati masu kao mjeru za određivanje veličine i konstante brzine rasta. Međutim, priznaje se da je duljina praktičnija mjera ako je ribe potrebno izabrati na temelju vizualnog promatranja na početku pokusa (tj. iz matične populacije).

(3) Ovaj je raspon duljina naveden u japanskom zakonu o kemikalijama: Testing Methods for New Chemical Substances etc. based on the Japan's Chemical Substances Control Law (CSCL).

Različite estuarijske i morske vrste rjeđe se upotrebljavaju, na primjer:

Sjenka	(*Leiostomus xanthurus*)
Ovčjeglava gavčica	(*Cyprinodon variegatus*)
Gavun	(*Menidia beryllina*)
Svjetlucavi grgeč	(*Cymatogaster aggregata*)
Engleski list	(*Parophrys vetulus*)
Tihomorska škrpina	(*Leptocottus armatus*)
Bodljikava koljuška	(*Gasterosteus aculeatus*)
Lubin	(*Dicentracus labrax*)
Uklija	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Slatkovodne ribe navedene u prethodnoj tablici jednostavne su za uzgoj i/ili su široko raspoložive tijekom čitave godine, dok je raspoloživost morskih i estuarijskih vrsta djelomično ograničena na pojedine zemlje. One se mogu uzgajati i razmnožavati u uzgajalištima ili u laboratoriju, uz nadzor bolesti i nametnika, kako bi se dobile zdrave ispitne životinje poznatog podrijetla. Ove su ribe raspoložive u mnogim dijelovima svijeta.

LITERATURA

1. Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Dodatak 4.

RASPOREDI UZORKOVANJA ZA ISPITIVANJA VODENIM IZLAGANJEM I IZLAGANJEM KROZ HRANU

1. **Teoretski primjer rasporeda uzorkovanja za ispitivanje biokoncentracije isključivo vodenim izlaganjem tvari čija je vrijednost log K_{OW} = 4**

Uzorkovanje riba	Vremenski raspored uzorkovanja		Br. uzoraka vode (1)	Br. riba po uzorku (1)
	Minimalna učestalost (dani) (2)	Dodatno uzorkovanje (dani) (2)		
Faza apsorpcije				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Faza izlučivanja				Prenijeti ribe u vodu bez ispitivane tvari
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
UKUPNO				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Vrijednosti u zagradama su količine uzoraka (vode, riba) koje treba uzeti ako se provodi dodatno uzorkovanje.
(2) Predispitna procijenjena vrijednost k_2 za tvar čiji je log K_{OW} = 4,0 iznosi 0,652 dan^{-1}. Ukupno trajanje pokusa utvrđuje se na 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dana, tj. 14 dana. Za procjenu t_{SS} vidjeti Dodatak 5.
(3) Uzorak vode uzeti nakon što se dopremi količina vode koja odgovara volumenu najmanje triju ispitnih komora.
(4) Te se ribe uzorkuju iz matične populacije.
(5) Ako su potrebne veća preciznost ili studije metabolizma koje zahtijevaju više riba, te bi ribe trebalo uzorkovati posebno na kraju faze apsorpcije i faze izlučivanja (vidjeti stavak 40.).
(6) Za analizu sadržaja lipida mogu biti potrebne najmanje tri dodatne ribe ako nije moguće upotrijebiti iste one ribe koje su uzorkovane za mjerenje koncentracije tvari na početku ispitivanja, na kraju faze apsorpcije i na kraju faze izlučivanja. Potrebno je napomenuti da bi u mnogim slučajevima trebale biti dovoljne tri kontrolne ribe (vidjeti stavak 56.).

▼M7

2. **Teoretski primjer rasporeda uzorkovanja za ispitivanje bioakumulacije tvari kroz hranu nakon faze apsorpcije od 10 dana i faze izlučivanja od 42 dana**

Uzorkovanje	Vremenski raspored uzorkovanja		Br. uzoraka hrane	Br. riba po uzorku	
	Dan faze	Dodatni uzorci riba?		Ispitna skupina	Kontrolna skupina
Faza apsorpcije					
1	0	Moguće (1) (2)	3 – ispitna skupina	0	5 – 10
			3 – kontrolna skupina (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Da (4)	3 – ispitna skupina	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – kontrolna skupina (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Faza izlučivanja					
3	1	Da (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Da (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Da (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
UKUPNO				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) Po tri uzorka iz kontrolne skupine i ispitne skupine analizira se radi utvrđivanja koncentracija ispitivane tvari i sadržaja lipida.
(2) Uzorci riba uzimaju se iz matične populacije što je moguće bliže početku ispitivanja; za utvrđivanje sadržaja lipida trebalo bi uzorkovati najmanje tri ribe iz matične populacije na početku ispitivanja.
(3) (Neobveznim) uzorkovanjem početkom faze apsorpcije dobivaju se podaci za izračun asimilacije ispitivane tvari putem hrane, koji se mogu usporediti s učinkovitošću asimilacije izračunate na temelju podataka iz faze izlučivanja.
(4) Može se uzorkovati pet dodatnih riba za analizu specifičnu za određeno tkivo.
(5) Za analizu sadržaja lipida mogu biti potrebne najmanje tri dodatne ribe ako nije moguće upotrijebiti iste one ribe koje su uzorkovane za mjerenje koncentracije tvari na početku ispitivanja, na kraju faze apsorpcije i na kraju faze izlučivanja. Potrebno je napomenuti da bi u mnogim slučajevima trebale biti dovoljne tri kontrolne ribe (vidjeti stavke 56. i 153.).

Napomena o trajanju faza i vremenima uzorkovanja Faza apsorpcije počinje u trenutku prvog hranjenja hranom s dodatkom. Pokusni dan traje od trenutka jednog hranjenja do neposredno prije trenutka sljedećeg hranjenja, 24 sata kasnije. Prvo uzorkovanje (br. 1 u tablici) trebalo bi izvršiti neposredno prije prvog hranjenja (npr. jedan sat). U idealnom slučaju, uzorkovanje tijekom ispitivanja trebalo bi provoditi neposredno prije hranjenja sljedećeg dana (tj. oko 23 sata nakon zadnjeg hranjenja na dan uzorkovanja). Faza apsorpcije završava neposredno prije prvog hranjenja hranom bez dodatka, kada započinje faza izlučivanja (ribe u ispitnoj skupini vjerojatno će i dalje probavljati hranu s dodatkom tijekom 24 sata nakon zadnjeg hranjenja hranom s dodatkom). To znači da bi zadnje uzorkovanje u fazi apsorpcije trebalo izvršiti neposredno prije prvog hranjenja hranom bez dodatka, a prvo uzorkovanje u fazi izlučivanja trebalo bi izvršiti oko 23 sata nakon prvog hranjenja hranom bez dodatka.

▼M7

Dodatak 5.

OPĆI IZRAČUNI

1. Uvod

2. Predviđanje trajanja faze apsorpcije

3. Predviđanje trajanja faze izlučivanja

4. Sekvencijska metoda: određivanje *konstante* brzine izlučivanja (gubitka) *k2*

5. Sekvencijska metoda: određivanje konstante brzine *apsorpcije* k1 (jedino metoda vodenog izlaganja)

6. Simultana metoda izračunavanja konstanti brzine apsorpcije i izlučivanja (gubitka) (jedino metoda vodenog izlaganja)

7. Ispravljanje u odnosu na razrjeđenje zbog rasta za kinetički BCF i BMF

8. Normiranje lipida na sadržaj lipida od 5 % (jedino metoda vodenog izlaganja)

1. UVOD

Opći model bioakumulacije pri vodenom izlaganju riba može se opisati u smislu procesa apsorpcije i izlučivanja (gubitka), zanemarujući apsorpciju preko hrane. Diferencijalna jednadžba (dC_f/dt) kojom se opisuje brzina promjene koncentracije u ribi (mg·kg^{-1}·dan^{-1}) glasi (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[jednadžba A5.1]}$$

pri čemu je

k_1 = konstanta brzine prvog reda za apsorpciju tvari u ribi (l·kg^{-1}·dan^{-1}).

k_2 = konstanta brzine prvog reda za izlučivanje tvari iz ribe (dan^{-1}).

k_g = konstanta brzine prvog reda za rast ribe („razrjeđenje zbog rasta”) (dan^{-1})

k_m = konstanta brzine prvog reda za metaboličku transformaciju (dan^{-1})

k_e = konstanta brzine prvog reda za fekalno izlučivanje (dan^{-1})

C_w = koncentracija u vodi (mg·l^{-1}).

C_f = koncentracija u ribi (mg·kg^{-1} mokre mase).

Za bioakumulacijske tvari može se očekivati da vremenski ponderirana prosječna vrijednost (TWA) bude najvažnija koncentracija pri izlaganju u vodi (C_w) unutar dopuštenog raspona fluktuacija (vidjeti stavak 24.). Preporučuje se izračunati vremenski ponderiranu prosječnu koncentraciju u vodi u skladu s postupkom iz Dodatka 6. ispitnoj metodi C.20. (2.). Treba napomenuti da je ln-transformacija koncentracije u vodi prikladna ako se očekuje eksponencijalno opadanje između razdoblja obnavljanja, npr. kod polustatičkih uvjeta ispitivanja. Kod protočnog sustava, ln-transformacija koncentracija pri izlaganju nije nužno potrebna. Ako se izračunaju vremenski ponderirane prosječne koncentracije u vodi, trebalo bi ih navesti u izvješću te upotrijebiti u kasnijim izračunima.

U standardnom ispitivanju vrijednosti BCF-a kod riba apsorpcija i izlučivanje mogu se opisati u smislu dvaju kinetičkih procesa prvog reda.

▼M7

Brzina apsorpcije = $k_1 \times C_w$ [jednadžba A5.2]

Ukupna brzina gubitka = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [jednadžba A5.3]

U stabilnom stanju, pod pretpostavkom da su rast i metabolizam zanemarivi (tj. vrijednosti za k_g i k_m nije moguće razlikovati od nule), brzina apsorpcije jednaka je brzini izlučivanja te se kombinacijom jednadžbe A5.2 i jednadžbe A5.3 dobiva sljedeći odnos:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [jednadžba A5.4]

pri čemu je:

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentracija u ribi u stabilnom stanju (mg kg^{-1} mokre mase).

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentracija u vodi u stabilnom stanju (mg l^{-1}).

Omjer k_1/k_2 poznat je kao kinetički BCF (BCF_K) i trebao bi biti jednak BCF-u u stabilnom stanju (BCF_{SS}) dobivenom iz omjera koncentracije u stabilnom stanju u ribi i one u vodi, pri čemu se mogu pojaviti odstupanja ako nije bilo sigurno je li postignuto stabilno stanje ili ako su na kinetički BCF primijenjene korekcije zbog rasta. Međutim, s obzirom na to da su k_1 i k_2 konstante, ne mora se postići stabilno stanje da bi se dobio BCF_K.

Na temelju navedenih jednadžbi prvog reda, u ovom Dodatku 5. navode se opći izračuni potrebni za metode ispitivanja bioakumulacije pri vodenom izlaganju i izlaganju kroz hranu. Međutim, odjeljci 5., 6. i 8. relevantni su jedino za metodu izlaganja kroz hranu, ali ovdje su uključeni jer se odnose na „opće" tehnike. Sekvencijske metode (odjeljci 4. i 5.) i simultane metode (odjeljak 6.) omogućuju izračunavanje konstanti apsorpcije i izlučivanja koje se upotrebljavaju za dobivanje kinetičkih BCF-ova. Sekvencijska metoda određivanja k_2 (odjeljak 4.) važna je za izlaganje kroz hranu jer se njome izračunavaju i učinkovitost asimilacije i BMF. U Dodatku 7. navode se detalji izračuna specifičnih za metodu izlaganja kroz hranu.

2. PREDVIĐANJE TRAJANJA FAZE APSORPCIJE

Vrijednost k_2, a time i određeni postotak vremena potrebnog da se postigne stabilno stanje, može se prije provedbe ispitivanja procijeniti iz empirijskih odnosa između k_2 i podjelnog koeficijenta *n*-oktanol/voda (K_{OW}) ili k_1 i BCF-a. Međutim, treba imati na umu da se jednadžbe koje su navedene u ovom odjeljku primjenjuju jedino kada obrasci apsorpcije i izlučivanje prate kinetiku prvog reda. Ako to očito nije slučaj, preporučuje se zatražiti mišljenje biostatističara i/ili farmakokinetičara ako su predviđanja koja se odnose na fazu apsorpcije poželjna.

Postoji više metoda s pomoću kojih se može procijeniti k_2 (dan^{-1}). Na primjer, u prvom se redu mogu upotrijebiti sljedeći empirijski odnosi ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); jednadžba A5.5]

ili

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [jednadžba A5.6]

pri čemu je $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (za tvari čiji je $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); jednadžba A5.7]

([1]) Kao i kod svakog empirijskog odnosa, trebalo bi provjeriti spada li ispitivana tvar u domenu primjenjivosti odnosa.

▼M7

i$BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); jednadžba A5.8]

W = srednja masa tretirane ribe (u gramima mokre mase) na kraju apsorpcije / na početku izlučivanja ([1])

Za druge odnose vidjeti (6.). Moglo bi biti korisno primijeniti složenije modele za procjenu k_2 ako, na primjer, postoji vjerojatnost da će doći do značajnog metabolizma (7., 8.). Međutim, što je model složeniji, to je potrebna veća pažnja pri tumačenju predviđanja. Na primjer, prisutnost nitro skupina mogla bi upućivati na brzi metabolizam, ali ne mora uvijek biti tako. Stoga bi pri planiranju ispitivanja korisnik trebao ocijeniti rezultate modela predviđanja uzimajući u obzir kemijsku strukturu i sve druge relevantne informacije (na primjer preliminarna ispitivanja).

Vrijeme potrebno da se postigne određeni postotak stabilnog stanja može se dobiti, primjenom procjene k_2, iz opće kinetičke jednadžbe kojom se opisuju apsorpcija i izlučivanje (kinetika prvog reda), pod pretpostavkom da su rast i metabolizam zanemarivi. Ako dođe do značajnog rasta tijekom ispitivanja, procjene opisane u nastavku neće biti pouzdane. U takvim je slučajevima bolje upotrijebiti k_{2g} ispravljen u odnosu na rast kako je opisano u nastavku (vidjeti odjeljak 7. ovog Dodatka):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[jednadžba A5.9]}$$

ili, ako je C_w stalan:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[jednadžba A5.10]}$$

Približavanjem stabilnom stanju ($t \rightarrow \infty$), jednadžba A5.10 može se svesti (vidjeti (9) (10)) na:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[jednadžba A5.11]}$$

ili

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[jednadžba A5.12]}$$

Tada je BCF × C_w aproksimacija koncentracije u ribi u stabilnom stanju ($C_{f\text{-}SS}$). [Napomena: isti se pristup može primijeniti kada se procjenjuje BMF u stabilnom stanju tijekom ispitivanja izlaganjem kroz hranu. U tom se slučaju u prethodno navedene jednadžbe umjesto BCF-a unosi BMF, a umjesto C_w vrijednost C_{food}, koncentracija u hrani]

Jednadžba A5.10 može se preoblikovati u:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[jednadžba A5.13]}$$

ili

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[jednadžba A5.14]}$$

Primjenom jednadžbe A5.14 vrijeme potrebno da se postigne određeni postotak stabilnog stanja može se predvidjeti ako se prije toga procijeni k_2 s pomoću jednadžbe A5.5 ili jednadžbe A5.6.

Za orijentaciju, statistički optimalno trajanje faze apsorpcije za dobivanje statistički prihvatljivih podataka (BCF_K) je vrijeme koje je potrebno da logaritamska krivulja koncentracije ispitivane tvari u ribama u ovisnosti o linearnom vremenu

([1]) Masa ribe na kraju faze apsorpcije može se procijeniti na temelju podataka iz prijašnjeg ispitivanja ili na temelju spoznaja o tome za koliko će se kod ispitivane vrste njezina masa koju ima na početku uobičajenog ispitivanja vjerojatno povećati tijekom uobičajene faze apsorpcije (npr. 28 dana) .

▼M7

dosegne barem 50 % stabilnog stanja (tj. 0,69/k_2), ali ne više od 95 % stabilnog stanja (tj. 3,0/k_2) (11). Ako akumulacija premaši 95 % stabilnog stanja, izračunavanje BCF_{SS} postaje izvedivo.

Vrijeme potrebno da se postigne 80 % stabilnog stanja iznosi (primjenom jednadžbe A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[jednadžba A5.15]}$$

ili

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[jednadžba A5.16]}$$

Slično tomu, vrijeme potrebno za postizanje 95 % stabilnog stanja iznosi:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[jednadžba A5.17]}$$

Primjerice, trajanje faze apsorpcije (tj. vrijeme potrebno da se postigne određeni postotak stabilnog stanja, npr. t_{80} ili t_{95}) za ispitivanu tvar čiji je log K_{OW} = 4 bilo bi (primjenom jednadžbe A5.5, jednadžbe A5.16 i jednadžbe A5.17):

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dan}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \text{dana (59 sati)}$$

$$\text{ili } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60 \text{dana (110 sati)}$$

Druga je mogućnost da se izraz:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \ (sati) \qquad \text{[jednadžba A5.18]}$$

upotrijebi za izračun vremena potrebnog za postizanje efektivnog stabilnog stanja (t_{eSS}) (12.). Za tvar čiji je log K_{OW} = 4 to daje:

$$t_{SS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \ sati$$

3. PREDVIĐANJE TRAJANJA FAZE IZLUČIVANJA

Predviđanje vremena potrebnog da se tjelesno opterećenje smanji na određeni postotak početne koncentracije može se isto tako dobiti i iz opće jednadžbe kojom se opisuju apsorpcija i izlučivanje (uz pretpostavku kinetike prvog reda, vidjeti jednadžbu A5.9 (1., 13).

Za fazu izlučivanja, pretpostavlja se da je C_w (ili C_{food} za ispitivanje izlaganjem kroz hranu) jednak nuli. Jednadžba se potom može svesti na:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[jednadžba A5.19]}$$

ili

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[jednadžba A5.20]}$$

pri čemu je $C_{f,0}$ koncentracija na početku razdoblja izlučivanja.

50 %-tno izlučivanje postiže se u vremenu (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ili

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Isto tako, 95 %-tno izlučivanje postiže se u:

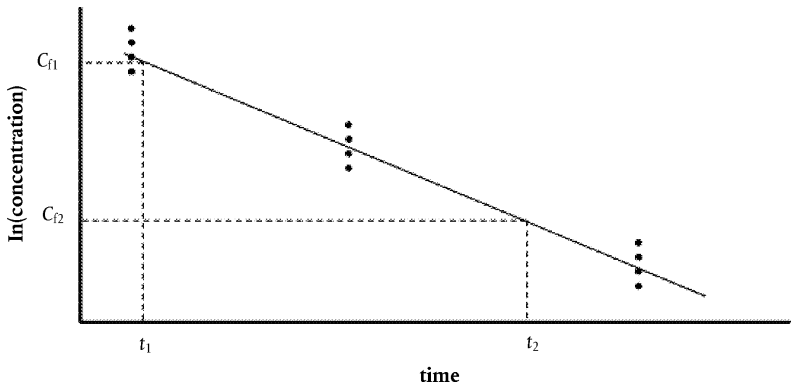
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Ako je u prvom razdoblju apsorpcija 80 % ($1{,}6/k_2$) te ako je u fazi izlučivanja gubitak 95 % ($3{,}0/k_2$), tada će faza izlučivanja trajati otprilike dvostruko duže od faze apsorpcije.

Treba napomenuti da se procjene temelje na pretpostavci da obrasci apsorpcije i izlučivanja prate kinetiku prvog reda. Ako je očito da ne vrijedi kinetika prvog reda, te procjene nisu valjane.

4. SEKVENCIJSKA METODA: ODREĐIVANJE KONSTANTE BRZINE IZLUČIVANJA (GUBITKA) K_2

Polazi se od pretpostavke da se većina podataka o biokoncentraciji može „prilično” dobro opisati jednostavnim dvoodjelnim/dvoparametarskim modelom, na što ukazuje pravac koji približno odgovara točkama koncentracija u ribama (na skali ln) tijekom faze izlučivanja.



Treba napomenuti da odstupanja od pravca mogu ukazivati na to da je obrazac izlučivanja složeniji od kinetike prvog reda. Grafičkom se metodom mogu razlučiti obrasci izlučivanja koji odstupaju od kinetike prvog reda.

Za izračunavanje k_2 za više vremena uzorkovanja provodi se linearna regresija ln(koncentracija) u odnosu na vrijeme. Nagib regresijskog pravca procjena je konstante brzine izlučivanja k_2 ([1]). Prosječna koncentracija u ribi na početku faze izlučivanja ($C_{0,d}$; što je jednako prosječnoj koncentraciji u ribi na kraju faze apsorpcije) može se lako izračunati iz odsječka pravca (uključujući granice dopuštenih pogrešaka) ([1]):

([1]) U većini programa koji omogućuju linearnu regresiju daju se i standardne pogreške i interval pouzdanosti procjena, npr. u programu Microsoft Excel s alatnim paketom za analizu podataka.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[jednadžba A5.21]}$$

Da bi se izračunao k_2 kada postoje samo dva vremena uzorkovanja (kao u smanjenom planu ispitivanja), treba unijeti dvije prosječne koncentracije u sljedeću jednadžbu:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[jednadžba A5.22]}$$

pri čemu su $\ln(C_{f1})$ i $\ln(C_{f2})$ prirodni logaritmi koncentracija u vremenu t_1 odnosno t_2, a t_2 i t_1 su vremena kada su uzeta dva uzorka u odnosu na početak izlučivanja ([1]).

5. SEKVENCIJSKA METODA: ODREĐIVANJE KONSTANTE BRZINE APSORPCIJE K_1 (JEDINO METODA VODENOG IZLAGANJA)

Da bi se za fazu apsorpcije pronašla vrijednost k_1 na temelju skupa podataka o koncentracijama u vremenskom slijedu, potrebno je upotrijebiti računalni program koji odgovara sljedećem modelu:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[jednadžba A5.23]}$$

pri čemu je k_2 dobiven prethodnim izračunom, $C_f(t)$ i $C_w(t)$ su koncentracije u ribi odnosno vodi u vremenu t.

Da bi se izračunao k_1 kada postoje samo dva vremena uzorkovanja (kao u smanjenom planu ispitivanja), upotrebljava se sljedeća formula:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[jednadžba A5.24]}$$

pri čemu je k_2 dobiven prethodnim izračunom, C_f je koncentracija u ribi na početku faze izlučivanja, a C_w je prosječna koncentracija u vodi tijekom faze apsorpcije ([2]).

Kako bi se procijenila valjanost prilagođavanja, nagibi k_1 i k_2 vizualno se pregledavaju u odnosu na grafički prikazane vrijednosti izmjerene u vremenima uzorkovanja. Ako se pokaže da se sekvencijskom metodom dobila slaba procjena za k_1, potrebno je primijeniti simultani pristup za izračunavanje k_1 i k_2 (vidjeti odjeljak 6.). I ovdje bi dobivene nagibe trebalo usporediti s grafički prikazanim izmjerenim podacima kako bi se vizualno provjerila valjanost prilagođavanja. Ako je valjanost prilagođavanja i dalje nezadovoljavajuća, to može ukazivati na činjenicu da ne vrijedi kinetika prvog reda te bi trebalo primijeniti druge, složenije modele.

6. SIMULTANA METODA IZRAČUNAVANJA KONSTANTI BRZINE APSORPCIJE I IZLUČIVANJA (GUBITKA) (JEDINO METODA VODENOG IZLAGANJA)

Mogu se upotrijebiti računalni programi za izračunavanje vrijednosti k_1 i k_2 na temelju skupa podataka o koncentracijama u vremenskom slijedu i modela:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[jednadžba A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[jednadžba A5.26]}$$

pri čemu je:

t_c = vrijeme na kraju faze apsorpcije.

Ovim se pristupom izravno dobivaju standardne pogreške za procjene k_1 i k_2. Ako se u jednadžbi A5.25 i jednadžbi A5.26 vrijednost k_1/k_2 zamijeni vrijednošću BCF (vidjeti jednadžbu A5.4), mogu se procijeniti standardna pogreška

([1]) Za razliku od metode linearne regresije, primjenom ove formule neće se dobiti standardna pogreška za k2.

([2]) Za razliku od postupka linearnog prilagođavanja, primjenom ove formule obično se neće dobiti standardna pogreška ili interval pouzdanosti za k1.

▼M7

i interval 95 %-tne pouzdanosti za BCF. To je posebno korisno kada se uspoređuju različite procjene koje su posljedica transformacije podataka. Zavisna varijabla (koncentracija u ribi) može se prilagoditi s ln-transformacijom ili bez nje te se može ocijeniti dobivena nesigurnost u pogledu BCF-a.

Budući da postoji snažna korelacija između parametara k_1 i k_2 ako se procjenjuju istodobno, možda je bolje prvo izračunati k_2 samo iz podataka o izlučivanju (vidjeti prethodno navedeno); k_2 se u većini slučajeva može prilično precizno procijeniti iz krivulje izlučivanja. Potom se k_1 može izračunati iz podataka o apsorpciji s pomoću nelinearne regresije ([1]). Savjetuje se da se pri sekvencijskom prilagođavanju podaci transformiraju na isti način.

Kako bi se procijenila valjanost prilagođavanja, dobiveni se nagibi mogu vizualno pregledati u odnosu na grafički prikazane vrijednosti izmjerene u vremenima uzorkovanja. Ako se pokaže da se ovom metodom dobila slaba procjena za k_1, potrebno je primijeniti simultani pristup za izračunavanje k_1 i k_2. Kao i prije, prilagođeni model potrebno je usporediti s grafički prikazanim izmjerenim podacima kako bi se vizualno provjerila valjanost prilagođavanja, a dobivene procjene parametara za k_1, k_2 i BCF te njihove standardne pogreške i/ili intervale pouzdanosti trebalo bi usporediti prema različitim vrstama prilagođavanja.

Ako valjanost prilagođavanja nije zadovoljavajuća, to može ukazivati na činjenicu da ne vrijedi kinetika prvog reda te bi trebalo primijeniti druge, složenije modele. Jedna od najčešćih komplikacija rast je riba tijekom ispitivanja.

7. ISPRAVLJANJE U ODNOSU NA RAZRJEĐENJE ZBOG RASTA ZA KINETIČKI BCF I BMF

U ovom se odjeljku opisuje standardna metoda ispravljanja zbog rasta riba tijekom ispitivanja (tzv. „razrjeđenje zbog rasta”), koja je valjana samo ako vrijedi kinetika prvog reda. U slučajevima u kojima postoje pokazatelji da kinetika prvog reda ne vrijedi, preporučuje se potražiti savjet biostatističara o prikladnom ispravljanju u odnosu na razrjeđenje zbog rasta ili primijeniti pristup koji se temelji na masi, koji je opisan u nastavku.

U nekim slučajevima metodi ispravljanja u odnosu na razrjeđenje zbog rasta nedostaje preciznosti ili ponekad ne djeluje (na primjer kod tvari koje se izlučuju vrlo polako i ispituju u ribama koje brzo rastu izvedena konstanta brzine izlučivanja ispravljena u odnosu na razrjeđenje zbog rasta k_{2g} može biti vrlo mala pa pogreška u dvjema konstantama brzina upotrijebljenima za dobivanje te vrijednosti postaje kritična te u nekim slučajevima procijenjena vrijednost k_g može biti viša od vrijednosti k_2). U takvim se slučajevima može primijeniti alternativni pristup (tj. pristup na temelju podataka o masi), kojim se izbjegava potreba za ispravljanjem i koji djeluje čak i kada nema kinetike prvog reda. Taj je pristup prikazan na kraju ovog odjeljka.

Ispravljanje u odnosu na rast metodom oduzimanja konstante brzine rasta

Kod standardne metode sve se pojedinačne mase i dužine preračunavaju u prirodne logaritme te se ln(masa) ili ln(1/masa) grafički prikazuje u odnosu na vrijeme (dan), odvojeno za ispitne i kontrolne skupine. Na isti se način postupa i s podacima koji su odvojeno dobiveni za fazu apsorpcije i fazu izlučivanja. Općenito, za ispravljanje u odnosu na razrjeđenje zbog rasta primjerenije je upotrijebiti podatke o masi iz cijelog ispitivanja da bi se

([1]) Treba imati na umu da se nesigurnost u procjeni k2 ne upotrebljava ispravno u bioakumulacijskom modelu ako se prije svega smatra konstantnom pri prilagođavanju k1 u metodi sekvencijskog prilagođavanja. Dobivena nesigurnost za BCF stoga će se razlikovati ovisno o tome upotrebljava li se simultana ili sekvencijska metoda prilagođavanja.

▼M7

dobila konstanta brzine rasta (k_g), ali statistički značajne razlike između konstanti brzine rasta dobivenih za fazu apsorpcije i fazu izlučivanja mogu upućivati na to da bi trebalo upotrijebiti konstantu brzine dobivenu za fazu izlučivanja. Ukupne brzine rasta koje su za ispitne i kontrolne skupine utvrđene ispitivanjima u kojima je primijenjeno vodeno izlaganje mogu se upotrijebiti za provjeru učinaka povezanih s tretiranjem.

Linearna korelacija u skladu s metodom najmanjih kvadrata izračunava se za ln(masa ribe) u odnosu na vrijeme (dan) (i za ln(1/masa) u odnosu na vrijeme (dan)) za svaku skupinu (ispitne i kontrolne skupine, pojedinačni podaci, ne dnevne srednje vrijednosti) za cijelo ispitivanje, fazu apsorpcije i fazu izlučivanja, primjenom standardnih statističkih postupaka. Izračunavaju se varijance u nagibu pravaca te se upotrebljavaju za procjenu statističke značajnosti (p = 0,05) razlike u nagibima (konstantama brzine rasta) primjenom Studentova t-testa (ili ANOVA-e ako se ispituje više od jedne koncentracije). Za potrebe ispravljanja u odnosu na rast uglavnom je poželjnije upotrebljavati podatke o masi. Podaci o duljini, s kojima se postupa na isti način, mogu biti korisni za uspoređivanje kontrolnih i ispitnih skupina u pogledu učinaka povezanih s tretiranjem. Ako se analizom podataka o masi ne utvrdi statistički značajna razlika, podaci dobiveni za ispitne i kontrolne skupine mogu se objediniti te se može izračunati ukupna konstanta brzine rasta riba u ispitivanju (k_g) kao ukupan nagib linearne korelacije. Ako se opaze statistički značajne razlike, konstante brzine rasta navode se odvojeno za svaku skupinu riba i/ili fazu ispitivanja. Konstantu brzine utvrđenu za pojedinu tretiranu skupinu trebalo bi potom upotrijebiti za potrebe ispravljanja u odnosu na razrjeđenje zbog rasta za tu skupinu. Ako su zabilježene statistički značajne razlike između konstanti brzine apsorpcije i izlučivanja, trebalo bi upotrijebiti konstante brzine dobivene u fazi izlučivanja.

Izračunana konstanta brzine rasta (k_g iskazan kao dan^{-1}) može se oduzeti od ukupne konstante brzine izlučivanja (k_2) kako bi se dobila konstanta brzine izlučivanja k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[jednadžba A5.27]}$$

Konstanta brzine apsorpcije dijeli se s konstantom brzine izlučivanja ispravljenom u odnosu na rast kako bi se dobio kinetički BCF ispravljen u odnosu na rast, koji se označuje kao BCF_{Kg} (ili BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[jednadžba A5.28]}$$

Konstanta brzine rasta dobivena za ispitivanje u kojemu je primijenjeno izlaganje kroz hranu upotrebljava se u jednadžbi A7.5 kako bi se izračunao BMF_{Kg} ispravljen u odnosu na rast (vidjeti Dodatak 7.).

Ispravljanje u odnosu na rast metodom koja se temelji na podacima o masi

Umjesto prethodno opisane „metode oduzimanja konstante brzine rasta” može se upotrijebiti i sljedeća metoda kako bi se izbjegla potreba za ispravljanjem u odnosu na rast. Temelji se na načelu upotrebe podataka o izlučivanju na osnovi mase po cijeloj ribi, a ne na osnovi koncentracije.

Koncentracije opažene u tkivima tijekom faze izlučivanja (masa ispitivane tvari/jedinična masa ribe) preračunavaju se u masu ispitivane tvari po ribi: koncentracije i pojedinačne mase riba povezuju se u obliku tablice (npr. primjenom računalne tablice) te se svaka koncentracija množi s masom cijele ribe kako bi se dobio skup podataka „masa ispitivane tvari/riba” za sve uzorke faze izlučivanja.

Prirodni logaritam dobiven iz podataka o masi tvari grafički se prikazuje u odnosu na vrijeme izvođenja pokusa (faza izlučivanja), kao i inače.

▼M7

Za metodu vodenog izlaganja, konstanta brzine apsorpcije izračunava se na uobičajen način (vidjeti odjeljke 4. i 6.; treba napomenuti da bi u jednadžbama za prilagođavanje krivulje za k_1 trebalo upotrijebiti „normalnu" vrijednost k_2) te se iz prethodno navedenih podataka izvodi konstanta brzine izlučivanja. Budući da vrijednost dobivena za konstantu brzine izlučivanja ne ovisi o rastu jer je izračunata na osnovi mase po cijeloj ribi, trebalo bi je označiti kao k_{2g}, a ne kao k_2.

8. NORMIRANJE LIPIDA NA SADRŽAJ LIPIDA OD 5 % (JEDINO METODA VODENOG IZLAGANJA)

O rezultatima za BCF (kinetički i u stabilnom stanju) dobivenima ispitivanjima u kojima je primijenjeno vodeno izlaganje trebalo bi izvijestiti i u odnosu na zadani sadržaj lipida u ribi od 5 % mokre mase, osim ako se može dokazati da se ispitivana tvar ne akumulira ponajprije u lipidima (npr. neke se perfluorirane tvari mogu vezati na proteine). Koncentracije u ribama ili vrijednost BCF potrebno je preračunati u sadržaj lipida od 5 % u odnosu na mokru masu. Ako su u svim točkama uzorkovanja upotrijebljene iste ribe za mjerenje koncentracija tvari i sadržaja lipida, svaku pojedinačnu koncentraciju izmjerenu u ribi potrebno je ispraviti u odnosu na sadržaj lipida u toj ribi.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[jednadžba A5.29]}$$

pri čemu je:

$C_{f,L}$ = koncentracija u ribi normirana u odnosu na lipide (mg kg^{-1} mokre mase)

L = udio lipida (na temelju mokre mase)

C_f = koncentracija ispitivane tvari u ribi (mg kg^{-1} mokre mase)

Ako analiza lipida nije provedena na svim uzorkovanim ribama, za normiranje vrijednosti BCF-a upotrebljava se srednja vrijednost lipida. Za BCF u stabilnom stanju trebalo bi upotrijebiti srednju vrijednost zabilježenu u tretiranoj skupini na kraju faze apsorpcije. Za normiranje vrijednosti kinetičkog BCF-a ponekad je opravdano primijeniti drukčiji pristup, primjerice ako se sadržaj lipida znatno promijenio tijekom faze apsorpcije ili faze izlučivanja. Međutim, u svakom bi slučaju brzina hranjenja trebala biti takva da se dramatične promjene u sadržaju lipida svedu na najmanju mjeru.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[jednadžba A5.30]}$$

pri čemu je:

BCF_{KL} = kinetički BCF normiran u odnosu na lipide (L kg^{-1})

L_n = srednja vrijednost udjela lipida (na temelju mokre mase)

BCF_K = kinetički BCF (L kg^{-1})

LITERATURA

1. Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

2. Poglavlje C.20 ovog Priloga, *Ispitivanje reproduktivne toksičnosti na vrsti Daphnia magna*.

3. Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

4. Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

5. Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

6. Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

7. Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

8. OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

9. Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

10. Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

11. Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

12. Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

13. Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Dodatak 6.

JEDNADŽBE KOJE SE ODNOSE NA ISPITIVANJE U KOJEMU SE PRIMJENJUJE VODENO IZLAGANJE: SKRAĆENO ISPITIVANJE

Ovaj se pristup opravdava činjenicom da je faktor biokoncentracije u potpunom ispitivanju moguće utvrditi kao faktor biokoncentracije u stabilnom stanju (BCF_{SS}) izračunavanjem omjera koncentracije ispitivane tvari u tkivu ribe u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u vodi, ili izračunavanjem kinetičkog faktora biokoncentracije (BCF_K) kao omjera konstante brzine apsorpcije k_1 u odnosu na konstantu brzine izlučivanja k_2. Vrijednost BCF_K valjana je čak i ako se tijekom faze apsorpcije ne postigne koncentracija tvari u stabilnom stanju, pod uvjetom da se faze apsorpcije i izlučivanja odvijaju približno u skladu s procesima kinetike prvog reda.

Ako se koncentracija tvari u tkivima (C_{f1}) izmjeri na kraju izlaganja (t_1) te ako se koncentracija u tkivu (C_{f2}) ponovo izmjeri nakon određenog vremena (t_2), konstanta brzine izlučivanja (k_2) može se procijeniti s pomoću formule A5.22 iz Dodatka 5.

Konstanta brzine apsorpcije, k_1, može se potom algebarski odrediti s pomoću formule A5.23 iz Dodatka 5. (gdje je C_f jednako C_{f1} i t je jednako t_1) (1). Kinetički faktor biokoncentracije za skraćeno ispitivanje (označen kao BCF_{Km} da bi se razlikovao od kinetičkog faktora biokoncentracije određenog drugim metodama) tada glasi:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[jednadžba A6.1]}$$

Koncentracije ili rezultate trebalo bi ispraviti u odnosu na razrjeđenje zbog rasta te normirati na sadržaj lipida u ribi od 5 % kako je opisano u Dodatku 5.

Vrijednost BCF_{SS} iz skraćenog ispitivanja vrijednost je BCF-a izračunana na kraju faze apsorpcije, pod pretpostavkom da je postignuto stabilno stanje To je moguće samo pretpostaviti jer dokazivanje nije moguće zbog nedovoljnog broja točki uzorkovanja.

$$\text{BCF}_{\text{SS}}\text{iz skraćenog ispitivanja} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[jednadžba A6.2]}$$

pri čemu je:

$C_{\text{f-minSS}}$ = koncentracija u ribi pri pretpostavljenom stabilnom stanju na kraju apsorpcije (mg kg^{-1} mokre mase).

$C_{\text{w-minSS}}$ = koncentracija u vodi pri pretpostavljenom stabilnom stanju na kraju apsorpcije (mg l^{-1}).

LITERATURA

1. Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Dodatak 7.

JEDNADZBE KOJE SE ODNOSE NA ISPITIVANJE U KOJEMU SE PRIMJENJUJE IZLAGANJE KROZ HRANU

1. Primjer sastava prikladne komercijalne hrane za ribu

2. Primjeri tehnika dodavanja dodatka hrani

3. Izračunavanje učinkovitosti asimilacije i faktora biomagnifikacije

4. Ispravak u odnosu na lipide

5. Ocjenjivanje razlika između izmjerene koncentracije u nultom vremenu (C0,m) i izvedene koncentracije u nultom vremenu (C0,d)

6. Smjernice za ispitivane tvari koje se vrlo brzo izlučuju

1. PRIMJER SASTAVA PRIKLADNE KOMERCIJALNE HRANE ZA RIBU

Glavni sastojak	udio u ribljem brašnu
Sirovi proteini	≤ 55,0 %
Sirova mast	≤ 15,0 % ([1])
Sirova vlakna	≥ 2,0 %
Vlaga	≥ 12 %
Pepeo	≥ 8 %

([1]) U nekim je regijama možda dostupna samo hrana za ribe u kojoj je koncentracija lipida puno niža od ove gornje granice. U tim bi slučajevima ispitivanja trebalo provesti s nižom koncentracijom lipida u hrani te u skladu s tim prilagoditi brzinu hranjenja na odgovarajući način kako bi se održalo dobro zdravstveno stanje riba. Sadržaj lipida u hrani ne smije se povećavati umjetnim putem dodavanjem previše ulja.

2. PRIMJERI TEHNIKA DODAVANJA DODATKA HRANI

Opće napomene

Kontrolnu hranu trebalo bi pripremiti na isti način kao i hranu s dodatkom, ali bez ispitivane tvari.

Kako bi se provjerila koncentracija u tretiranoj hrani, trebalo bi uzeti tri uzorka dozirane hrane prikladnom metodom ekstrakcije te u uzetom ekstraktu izmjeriti koncentraciju ispitivane tvari ili radioaktivnost. Trebalo bi dokazati visoku analitičku stopu izdvajanja (> 85 %) i nisku varijaciju među uzorcima (tri uzorka koncentracije tvari uzeta na početku ispitivanja ne bi smjela odstupati više od ± 15 % od srednje vrijednosti).

Tijekom ispitivanja izlaganjem kroz hranu trebalo bi nultog dana ispitivanja i na kraju faze apsorpcije uzeti tri uzorka hrane kako bi se odredio sadržaj ispitivane tvari u hrani.

Pripremanje hrane za ribe s tekućim ispitnim materijalom (čistim)

Utvrdi se ciljna nazivna ispitna koncentracija u tretiranoj hrani za ribu, na primjer 500 µg ispitivane tvari/g hrane. Odgovarajuća količina (prema molnoj masi ili specifičnoj radioaktivnosti) čiste ispitivane tvari doda se poznatoj masi hrane za ribe u staklenci ili balonu rotacijskog isparivača. Masa hrane za ribe trebala bi biti dovoljna za cijelu fazu apsorpcije (uzimajući u obzir potrebu za

▼M7

povećanjem količina pri svakom hranjenju zbog rasta riba). Hranu za ribe i ispitivanu tvar trebalo bi miješati preko noći sporim okretanjem (npr. s pomoću *roto-rack* miješalice ili rotiranjem ako se upotrebljava rotacijski isparivač). Hranu s dodatkom trebalo bi do upotrebe čuvati u uvjetima kojima se održava stabilnost ispitivane tvari u smjesi hrane (npr. rashlađivanjem).

Pripremanje hrane za ribe s kukuruznim ili ribljim uljem kao nosačem

Krute ispitivane tvari trebalo bi usitniti u tarioniku u fini prah. Tekuće ispitivane tvari mogu se izravno dodati u kukuruzno ili riblje ulje. Ispitivana tvar otopi se u poznatoj količini kukuruznog ili ribljeg ulja (npr. 5-15 ml). Dozirano ulje prenese se u balon rotacijskog isparivača prikladne veličine. Tikvicu u kojoj se pripremalo dozirano ulje trebalo bi isprati dvama malim alikvotima ulja koji se potom dodaju u balon kako bi se osiguralo da je sva otopljena ispitivana tvar prenesena. Kako bi se osiguralo potpuno otapanje/disperzija u ulju (ili ako se upotrebljava više ispitivanih tvari u ispitivanju), dodaje se mikromiješalica, tikvica se začepi te se smjesa brzo miješa tijekom noći. U balon se dodaje odgovarajuća količina hrane za ribe (obično u obliku peleta) te se sadržaj balona homogeno izmiješa neprestanim okretanjem staklenog balona najmanje 30 minuta, no po mogućnosti tijekom noći. Potom se hrana s dodatkom skladišti na odgovarajući način (npr. u hladnjaku) kako bi se osigurala stabilnost ispitivane tvari u hrani do upotrebe.

Pripremanje hrane za ribe s organskim otapalom

Odgovarajuća količina ispitivane tvari (prema molnoj masi ili specifičnoj radioaktivnosti) dovoljna za postizanje ciljane doze otopi se u odgovarajućem organskom otapalu (npr. cikloheksanu ili acetonu; 10 do 40 ml, ili veći volumen ako je potrebno ovisno o količini hrane kojoj će se dodati dodatak). Alikvot ili sva količina (koja se dodaje dio po dio) ove otopine pomiješa se s odgovarajućom masom hrane za ribe dovoljnom da se postigne nazivna razina doze koja je potrebna za ispitivanje. Hrana i ispitivana tvar mogu se izmiješati u posudi od nehrđajućeg čelika te svježe dozirana hrana za ribe držati u toj posudi u laboratorijskom sušioniku dva dana (uz povremeno miješanje) kako bi ispario višak otapala ili se mogu izmiješati u rotacijskom isparivaču uz neprestanu rotaciju. Ako je potrebno, višak otapala može se ukloniti strujom zraka ili dušika. Potrebno je pobrinuti se da ispitivana tvar ne kristalizira tijekom uklanjanja otapala. Hranu s dodatkom trebalo bi do upotrebe čuvati u uvjetima kojima se održava stabilnost ispitivane tvari u smjesi hrane (npr. rashlađivanjem).

3. IZRAČUNAVANJE UČINKOVITOSTI ASIMILACIJE I FAKTORA BIOMAGNIFIKACIJE

Da bi se izračunala učinkovitost asimilacije, prvo je potrebno procijeniti ukupnu konstantu brzine izlučivanja u skladu s odjeljkom 4. Dodatka 5. (s pomoću „sekvencijske metode”, tj. standardne linearne regresije) na temelju srednjih vrijednosti koncentracija izmjerenih u uzorcima tijekom faze izlučivanja. Konstanta brzine hranjenja, I, i trajanje apsorpcije, t, poznati su parametri ispitivanja. C_{food}, srednja izmjerena koncentracija ispitivane tvari u hrani, varijabla je koja se mjeri tijekom ispitivanja. $C_{0,\text{d}}$, koncentracija ispitivane tvari u ribi na kraju faze apsorpcije, obično se izvodi iz odsječka pravca koji prikazuje ln(koncentracija) u ovisnosti o danu izlučivanja.

Učinkovitost asimilacije tvari (a, apsorpcija ispitivane tvari u cijeloj utrobi) izračunava se kao:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[jednadžba A7.1]}$$

pri čemu je:

$C_{0,d}$ = izvedena koncentracija u ribi u nultom vremenu faze izlučivanja (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = ukupna (neispravljena u odnosu na rast) konstanta brzine izlučivanja (dan^{-1}), izračunana prema jednadžbama iz Dodatka 5. odjeljka 3.;

I = konstanta brzine konzumacije hrane (g hrane g^{-1} ribe dan^{-1});

C_{food} = koncentracija u hrani (mg kg^{-1} hrane);

t = trajanje razdoblja hranjenja (u danima)

Međutim, možda će brzinu hranjenja, I, koja se upotrebljava u izračunu trebati prilagoditi u odnosu na rast riba kako bi se dobila točna vrijednost učinkovitosti asimilacije a. U ispitivanju u kojemu ribe znatno rastu tijekom faze apsorpcije (u kojoj se količine hrane ne ispravljaju kako bi se održala zadana brzina hranjenja), odvijanjem faze apsorpcije stvarna se brzina hranjenja sve više snižava u odnosu na zadanu, što dovodi do veće „stvarne" učinkovitosti asimilacije (treba napomenuti da ovo nije važno za ukupan izračun vrijednosti BMF-a jer se članovi vrijednosti I poništavaju između jednadžbe A7.1 i jednadžbe A7.4). Srednja vrijednost brzine hranjenja ispravljena u odnosu na razrjeđenje zbog rasta, I_g, može se odrediti na više načina, ali jednostavan je i točan način taj da se na temelju poznate konstante brzine rasta (k_g) procijene mase ispitne ribe u vremenskim točkama tijekom faze apsorpcije, tj.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[jednadžba A7.2]}$$

pri čemu je:

$W_f(t)$ = srednja masa ribe na dan t faze apsorpcije

$W_{f,0}$ = srednja masa ribe na početku pokusa

Na ovaj se način (u najmanju ruku) može procijeniti srednja masa ribe zadnjeg dana izlaganja ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$). S obzirom na to da je brzina hranjenja utvrđena na temelju $W_{f,0}$, stvarna brzina hranjenja za svaki dan faze apsorpcije može se izračunati primjenom tih dviju masenih vrijednosti. Brzina hranjenja ispravljena u odnosu na rast, I_g (g hrane g^{-1} ribe dan^{-1}), koju treba upotrijebiti umjesto I u slučaju brzog rasta tijekom faze apsorpcije, može se tada izračunati kao:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end-of-uptake}} \qquad \text{[jednadžba A7.3]}$$

Nakon što se dobije učinkovitost asimilacije, BMF se može izračunati tako da se ona pomnoži s konstantom brzine hranjenja I (ili I_g, ako je upotrijebljen za izračunavanje vrijednosti α) te dobiveni umnožak podijeli s ukupnom konstantom brzine izlučivanja k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[jednadžba A7.4]}$$

Na isti bi način trebalo izračunati i faktor biomagnifikacije ispravljen u odnosu na rast, primjenjujući konstantu brzine izlučivanja ispravljenu u odnosu na rast (izvedenu u skladu s odjeljkom 7. Priloga 5.). Ponovno, ako je za izračunavanje vrijednosti α upotrijebljen I_g, i ovdje bi ga trebalo upotrijebiti umjesto I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[jednadžba A7.5]}$$

pri čemu je:

α = učinkovitost asimilacije (apsorpcija ispitivane tvari u cijeloj utrobi);

k_2 = ukupna (neispravljena u odnosu na rast) konstanta brzine izlučivanja (dan^{-1}), izračunana prema jednadžbama iz Dodatka 5. odjeljka 3.;

▼M7

k_{2g} = konstanta brzine izlučivanja ispravljena u odnosu na rast (dan^{-1});

I = konstanta brzine konzumacije hrane (g hrane g^{-1} ribe dan^{-1});

Poluvijek ispravljen u odnosu na rast ($t_{1/2}$) izračunava se na sljedeći način.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[jednadžba A7.6]}$$

Učinkovitost asimilacije tvari iz hrane može se isto tako procijeniti ako se utvrde ostaci u tkivu tijekom linearne faze faze apsorpcije (između 1. i 3. dana). U tom se slučaju učinkovitost asimilacije tvari (α) može odrediti na sljedeći način:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[jednadžba A7.7]}$$

pri čemu je:

$C_{fish}(t)$ = koncentracija ispitivane tvari u ribi u vremenu t (mg kg^{-1} mokre mase).

4. ISPRAVAK U ODNOSU NA LIPIDE

Ako je sadržaj lipida izmjeren u istim ribama na kojima je provedena kemijska analiza u svim intervalima uzorkovanja, tada bi pojedinačne koncentracije trebalo ispraviti u odnosu na lipide te grafički prikazati prirodni logaritam koncentracije (ispravljene u odnosu na lipide) u ovisnosti o izlučivanju (dan) kako bi se dobili $C_{0,d}$ i k_2. Učinkovitost asimilacije (jednadžba A7.1) može se tada izračunati na temelju lipida, upotrebljavajući C_{food} na temelju lipida (tj. C_{food} se pomnoži sa srednjom vrijednošću udjela lipida u hrani). Dodatnim izračunom s pomoću jednadžbe A7.4 i jednadžbe A7.5 izravno se dobije BMF ispravljen u odnosu na lipide (i ispravljen u odnosu na razrjeđenje zbog rasta).

U protivnom se srednje vrijednosti udjela lipida (na temelju mokre mase) u ribi i u hrani izvode i za izloženu i za kontrolnu skupinu (za hranu i za ribe iz kontrolne skupine ta se vrijednost obično izvodi iz podataka izmjerenih na početku i na kraju izlaganja; za ribe u izloženoj skupini ta se vrijednost obično izvodi iz podataka izmjerenih samo na kraju izlaganja). U nekim ispitivanjima sadržaj lipida u ribi može se značajno povećati; u takvim je slučajevima primjerenije upotrijebiti srednju vrijednost koncentracije lipida u ispitnoj ribi izračunanu s pomoću vrijednosti izmjerenih na kraju izlaganja i na kraju izlučivanja. Općenito, za dobivanje obaju udjela lipida trebali bi se upotrijebiti samo podaci koji se odnose na izloženu skupinu.

Faktor ispravka u odnosu na lipide (L_c) izračunava se kao:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[jednadžba A7.8]}$$

pri čemu su L_{fish} i L_{food} srednje vrijednosti udjela lipida u ribi odnosno hrani.

Faktor ispravka u odnosu na lipide upotrebljava se za izračunavanje faktora biomagnifikacije ispravljenog u odnosu na lipide (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[jednadžba A7.9]}$$

5. OCJENJIVANJE RAZLIKA IZMEĐU IZMJERENE KONCENTRACIJE U NULTOM VREMENU ($C_{0,M}$) I IZVEDENE KONCENTRACIJE U NULTOM VREMENU ($C_{0,D}$)

Izmjerenu koncentraciju u nultom vremenu ($C_{0,m}$) i izvedenu koncentraciju u nultom vremenu ($C_{0,d}$) trebalo bi usporediti. Ako su vrlo slične, to ukazuje na to da je model prvog reda koji je upotrijebljen za dobivanje parametara izlučivanja primjeren.

▼M7

U nekim ispitivanjima može postojati izrazita razlika između izvedene vrijednosti u nultom vremenu, $C_{0,d}$, i srednje izmjerene koncentracije u nultom vremenu, $C_{0,m}$ (vidjeti zadnju alineju stavka 159. ove ispitne metode). Ako je $C_{0,d}$ puno niži od $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), ta razlika može upućivati na to da je u utrobi prisutna neprobavljena hrana s dodatkom. To se može ispitati pokusom provođenjem odvojene analize na izrezanoj utrobi ako su na kraju faze apsorpcije uzeti i pohranjeni dodatni uzorci (cijele ribe). U protivnom, ako statistički valjano ispitivanje netipičnih vrijednosti primijenjeno na linearnu regresiju faze izlučivanja pokaže da je prva točka uzorkovanja izlučivanja pogrešno povećana, može biti primjereno provesti linearnu regresiju da se dobije k_2, ali uz izostavljanje vrijednosti koncentracije u prvoj točki izlučivanja. U takvim slučajevima, ako se nesigurnost u pogledu linearne regresije značajno smanji te je očito da u izlučivanju približno vrijedi kinetika prvog reda, može biti primjereno upotrijebiti dobivene vrijednosti $C_{0,d}$ i k_2 za izračunavanje učinkovitosti asimilacije. To se mora u cijelosti obrazložiti u izvješću. Isto se tako može dogoditi da u fazi izlučivanja ne vrijedi kinetika prvog reda. Ako je to vjerojatno tako (tj. čini se da podaci transformirani u prirodni logaritam slijede krivulju, a ne pravac linearne regresije), tada izračuni vrijednosti k_2 i $C_{0,d}$ vjerojatno nisu valjani te bi trebalo zatražiti savjet biostatističara.

Ako je $C_{0,d}$ puno viši od izmjerene vrijednosti ($C_{0,d} >> C_{0,m}$) to može upućivati na sljedeće: da je tvar izlučena vrlo brzo (tj. vrlo rano u fazi izlučivanja točke uzorkovanja približile su se granici kvantifikacije analitičke metode, vidjeti odjeljak 6. dalje u tekstu); da je u izlučivanju došlo do odstupanja od kinetike prvog reda; da je linearna regresija za izvođenje vrijednosti k_2 i $C_{0,d}$ manjkava; ili da se u nekim vremenskim točkama uzorkovanja pojavio problem u vezi s koncentracijama izmjerenima tijekom ispitivanja. U takvim bi slučajevima trebalo pregledati grafički prikaz linearne regresije kako bi se identificirali uzorci koji se nalaze na granici kvantifikacije ili blizu granice kvantifikacije, netipične vrijednosti i očita iskrivljenja (koja upućuju na to da ne vrijedi kinetika prvog reda) te ih jasno navesti u izvješću. Svako kasnije ponovno ocjenjivanje linearne regresije koje se provodi radi poboljšanja procijenjenih vrijednosti trebalo bi opisati i opravdati. Ako se uoči izrazito odstupanje od kinetike prvog reda, tada izračuni vrijednosti k_2 i $C_{0,d}$ vjerojatno nisu valjani te bi trebalo zatražiti savjet biostatističara.

6. SMJERNICE ZA ISPITIVANE TVARI KOJE SE VRLO BRZO IZLUČUJU

Kao što je navedeno u stavku 129. ove ispitne metode, neke se tvari mogu tako brzo izlučiti da nije moguće odrediti pouzdanu koncentraciju u nultom vremenu, $C_{0,d}$, ni k_2 jer se u uzorcima u vrlo ranoj fazi izlučivanja (tj. od drugog uzorka pri izlučivanju pa nadalje) tvar ne može više učinkovito izmjeriti (koncentracije na granici kvantifikacije). Takva je situacija opažena u međulaboratorijskom testu koji je proveden s benzo[a]pirenom u svrhu potvrđivanja ove ispitne metode te je dokumentirana u validacijskom izvješću za ovu metodu. U takvim se slučajevima linearna regresija ne može pouzdano provesti te će vjerojatno dati nerealno visoku procjenu vrijednosti $C_{0,d}$, a time i učinkovitost asimilacije koja je očito puno veća od 1. U tim je slučajevima moguće konzervativno procijeniti vrijednost k_2 te izračunati gornju granicu vrijednosti BMF-a.

Upotrebljavajući podatkovne točke faze izlučivanja u kojima je izmjerena koncentracija, uključujući i prvu koncentraciju koja „nije detektirana” (koncentracija na granici kvantifikacije), linearnom regresijom (na temelju podataka o koncentraciji transformiranih u prirodni logaritam u ovisnosti o vremenu) dobije se procijenjena vrijednost k_2. U tim vrstama slučajeva vjerojatno će biti uključene samo dvije podatkovne točke (npr. 1. i 2. dan uzorkovanja pri izlučivanju) pa se k_2 može procijeniti s pomoću jednadžbe A5.22 iz Dodatka 5. Ta procijenjena vrijednost k_2 može se upotrijebiti za procjenu učinkovitosti asimilacije s pomoću jednadžbe A7.1, pri čemu se u toj

▼M7

jednadžbi vrijednost $C_{0,d}$ zamijeni izmjerenom koncentracijom u nultom vremenu ($C_{0,m}$) u slučajevima kada je prema procjenama $C_{0,d}$ očito puno viši od vrijednosti koju bi bilo moguće dobiti ispitivanjem. Ako se $C_{0,m}$ nije mogao izmjeriti, trebalo bi upotrijebiti granicu detekcije u tkivu ribe. Ako se, u nekim slučajevima, time dobije vrijednost $\alpha > 1$, tada se pretpostavlja da je učinkovitost asimilacije od 1 „najgori slučaj”.

Najveći BMF_K može se tada procijeniti s pomoću jednadžbe A7.4 te bi ga trebalo navesti kao vrijednost „puno manje od” (<<). Na primjer, za ispitivanje u kojemu se primjenjuje brzina hranjenja 3 % i poluvijek izlučivanja kraći od tri dana te „najgori slučaj” vrijednosti α od 1, vrijednost BMF_K vjerojatno će biti niža od oko 0,13. S obzirom na svrhu ovih procjena i činjenicu da su one oprezne, vrijednosti koje se njima dobiju nije potrebno ispravljati u odnosu na razrjeđenje zbog rasta ili u odnosu na sadržaj lipida u ribi ili hrani.

▼M7

Dodatak 8.

PRISTUPI PROCJENJIVANJU PROVIZORNIH BCF-ova NA TEMELJU PODATAKA PRIKUPLJENIH TIJEKOM ISPITIVANJA IZLAGANJEM KROZ HRANU

Metoda izlaganja kroz hranu uključena je u ovu ispitnu metodu radi ispitivanja bioakumulacije tvari koje se u praksi ne mogu ispitati metodom vodenog izlaganja. Metodom vodenog izlaganja dobije se faktor biokoncentracije, dok se metodom izlaganja kroz hranu dobiju izravno informacije o potencijalu biomagnifikacije kroz hranu. U mnogim programima kemijske sigurnosti zahtijevaju se informacije o biokoncentraciji u vodenim vrstama (na primjer u procjeni rizika i Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja). Stoga postoji potreba da se podaci dobiveni tijekom ispitivanja izlaganjem kroz hranu upotrijebe za procjenu faktora biokoncentracije koji je usporediv s ispitivanjima koja se provode u skladu s metodom vodenog izlaganja ([1]). U ovom se odjeljku ispituju pristupi koji se mogu primijeniti u tu svrhu, ali navode i nedostaci koji su svojstveni procjenama.

Pri ispitivanju izlaganjem kroz hranu mjeri se izlučivanje kako bi se dobila konstanta brzine izlučivanja, k_2. Ako se konstanta brzine apsorpcije može procijeniti s pomoću raspoloživih podataka za situaciju u kojoj je riba bila izložena ispitivanoj tvari putem vode, tada se može procijeniti kinetički BCF.

Procjena konstante brzine apsorpcije za vodeno izlaganje počiva na mnogim pretpostavkama, a sve one pridonose nesigurnosti procjene. Nadalje, u ovom se pristupu procjeni BCF-a pretpostavlja da ukupna brzina izlučivanja (uključujući i faktore koji joj pridonose poput raspodjele u tijelu i pojedinačnih procesa izlučivanja) ne ovisi o tehnici izlaganja koja se primjenjuje da bi se postiglo tjelesno opterećenje ispitivanom tvari.

Glavne pretpostavke svojstvene ovoj metodi procjene mogu se sažeti kako slijedi:

izlučivanje nakon apsorpcije preko hrane jednako je izlučivanju nakon vodenog izlaganja za određenu tvar,

pri apsorpciji iz vode vrijedi kinetika prvog reda.

Ovisno o metodi upotrijebljenoj za procjenu apsorpcije:

— apsorpcija može biti u korelaciji samo s masom ribe,

— apsorpcija može biti u korelaciji samo s podjelnim koeficijentom oktanol-voda predmetne tvari,

— apsorpcija može biti u korelaciji s kombinacijom mase ribe i podjelnog koeficijenta oktanol-voda predmetne tvari,

— čimbenici koji u praksi mogu utjecati na apsorpciju pri ispitivanju vodenim izlaganjem, kao što su bioraspoloživost tvari, adsorpcija na opremu, molekularna veličina itd., imaju malen učinak,

— i, od ključne važnosti:

baza podataka (‚set za testiranje') koja se upotrebljavala za razvoj metode procjenjivanja apsorpcije reprezentativna je za tvar koju se razmatra.

U više radova objavljenih u literaturi izvedene su jednadžbe kojima se apsorpcija iz vode putem škrga riba povezuje s podjelnim koeficijentom oktanol-voda koji se odnosi na tvar, masom ribe (1., 2., 3., 4.), volumenom i/ili sadržajem lipida, prodiranjem/difuzijom kroz membranu (5., 6.), volumenom disanja ribe (7.) te primjenom pristupa koji se temelji na fugacitetu/bilanci mase (8., 9., 10.). Te metode, primijenjene u ovom kontekstu, detaljno su ocijenili Crookes i Brooke

([1]) U prirodi se najveća izloženost u vodenom okolišu najčešće postiže konzumacijom kad je riječ o vrlo hidrofobnim tvarima, pa tako procijenjeni BCF nije strogo reprezentativan za bioakumulacijski potencijal takve tvari.

▼M7

(11.). Rad koji je objavio Barber (12.), koji se usredotočuje na modeliranje bioakumulacije povezane s apsorpcijom kroz hranu, isto je tako koristan u ovom kontekstu jer sadržava podatke dobivene modelima brzine apsorpcije preko škrga. Toj problematici posvećen je i dio referentnog dokumenta za protokol iz 2004. (13.).

Čini se da je većina tih modela izrađena na temelju ograničenih baza podataka. Kod modela za koje su dostupne pojedinosti o bazi podataka upotrijebljenoj za njegovu izradu, čini se da su vrste upotrijebljenih tvari često slične strukture ili razreda (u smislu djelovanja, npr. organoklorini). To pridonosi nesigurnosti u pogledu primjene modela za predviđanje konstante brzine apsorpcije za različite vrste stvari, a da ne govorimo o razmatranjima koja su specifična za pojedino ispitivanje, poput ispitne vrste, temperature itd.

U pregledu raspoloživih tehnika (11.) istaknuto je da nijedna metoda nije‚ispravnija' od drugih. Stoga bi trebalo dati jasno obrazloženje za upotrijebljeni model. Ako postoji više metoda čija upotreba može biti opravdana, bilo bi razborito predočiti više procjena vrijednosti k_1 (pa tako i vrijednosti BCF-a) ili raspon vrijednosti k_1 (i BCF-a) prema više metoda procjene apsorpcije. Međutim, s obzirom na razlike u vrstama modela i bazama podataka upotrijebljenih za njihovu izradu, ne bi bilo primjereno uzimati srednju vrijednost iz procjena dobivenih na različite načine.

Neki su istraživači postulirali da je kod ovakvih procjena vrijednosti BCF-a potreban ispravak u odnosu na bioraspoloživost kako bi se uzela u obzir adsorpcija tvari na otopljeni organski ugljik (DOC) u uvjetima vodenog izlaganja i time procjena uskladila s rezultatima ispitivanja u kojima je primijenjeno vodeno izlaganje (npr. 13., 14.). Međutim, taj ispravak možda nije primjeren s obzirom na niske razine DOC-a koje su potrebne u ispitivanju vodenim izlaganjem za procjenu u‚najgorem slučaju' (tj. omjer bioraspoložive tvari i tvari izmjerene u otopini). U slučaju vrlo hidrofobnih tvari, apsorpciju preko škrga može ograničavati brzina pasivne difuzije blizu površine škrga; u tom je slučaju moguće da se ispravkom više uzima u obzir taj učinak nego ono za što je ispravak bio namijenjen.

Savjetuje se usredotočiti se na metode koje zahtijevaju lako dostupne podatke o tvarima koje se ispituju izlaganjem kroz hranu kako je ovdje opisano (tj. log K_{OW}, masa ribe). Mogu se primijeniti druge metode za koje su izvori podataka složeniji, ali će za njih možda trebati dodatna mjerenja tijekom ispitivanja ili detaljni podaci o ispitivanoj tvari ili ribljoj vrsti koji možda nisu lako dostupni. Osim toga, na izbor modela može utjecati razina validacije i domena primjenjivosti (vidjeti 11. za pregled i usporedbu različitih metoda).

Trebalo bi imati na umu da procijenjena vrijednost k_1 i procijenjeni BCF nisu sigurni te će ih možda trebati podvrgnuti analizi snage dokaza zajedno s dobivenim BMF-om i parametrima koji se odnose na tvar (npr. molekularna veličina) kako bi se dobila ukupna slika o bioakumulacijskom potencijalu tvari. Tumačenje i upotreba tih parametara mogu ovisiti o regulatornom okviru.

LITERATURA

1. Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

2. Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

3. Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

4. Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

5. Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

6. Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

7. Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

8. Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

9. Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

10. Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

11. Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

12. Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

13. Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

14. Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. TEST RASTA JUVENILNIH RIBA

1. METODA

Ova metoda ispitivanja toksičnih učinaka na rast odgovara smjernici OECD TG 215 (2000.).

1.1. UVOD

Ovaj je test namijenjen ocjenjivanju učinaka dugotrajnog izlaganja kemikalijama na rast juvenilnih riba. On se temelji na metodi za ocjenjivanje učinaka kemikalija na rast juvenilne kalifornijske pastrve (*Oncorynchus mykiss*) u protočnim uvjetima, koja je izrađena i ispitana u prstenastom testu (1)(2) unutar Europske unije. Mogu se koristiti i druge dobro dokumentirane vrste. Primjerice, postoje iskustva s testovima rasta sa zebricom (*Danio rerio*) ([1]) (3)(4) i medakom (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Vidjeti također Opći uvod, dio C.

1.2. DEFINICIJE

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC): najniža ispitana koncentracija kod koje je uočen značajan učinak ispitivane tvari (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a moraju imati jednak ili veći štetan učinak od onog koji je zabilježen pri LOEC-u.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC): ispitna koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

EC_x: kod ove ispitne metode, koncentracija ispitivane tvari koja izaziva x %-tnu promjenu brzine rasta riba u usporedbi s kontrolama.

Količina punjenja: mokra masa ribe po volumenu vode.

Gustoća nasada: broj riba po volumenu vode.

Pojedinačna specifična brzina rasta ribe: brzina rasta jedne jedinke na temelju početne mase.

Prosječna specifična brzina rasta po bazenu: srednja brzina rasta populacije bazena pri određenoj koncentraciji.

Pseudospecifična brzina rasta: brzina rasta pojedine ribe u odnosu na početnu srednju masu populacije bazena.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Juvenilne ribe u fazi eksponencijalnog rasta se izvažu, stave u ispitne komore i izlože nizu subletalnih koncentracija ispitivane tvari otopljene u vodi, po mogućnosti u protočnim uvjetima ili, ako to nije moguće, u odgovarajućim polustatičkim uvjetima (statičko s obnavljanjem vode). Ispitivanje traje 28 dana. Ribe se hrane jedanput dnevno. Količina hrane temelji se na početnoj masi riba i može se preračunati nakon 14 dana. Na kraju ispitivanja se ribe ponovno izvažu. Učinci na brzinu rasta analiziraju se uz pomoć regresijskog modela da bi se dobila procjena koncentracije koja izaziva x %-tnu promjenu brzine rasta tj. EC_x (npr. EC_{10}, EC_{20} ili EC_{30}). Druga je mogućnost da se podaci usporede s kontrolnim vrijednostima i odredi najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC), a time i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC).

1.4. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Trebaju biti raspoloživi rezultati ispitivanja akutne toksičnosti (vidjeti metodu C.1.), po mogućnosti na vrsti odabranoj za ovo ispitivanje. To znači da mora biti poznata topljivost u vodi i tlak pare ispitivane tvari i da mora biti raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama s poznatom i dokumentiranom točnošću i granicom detekcije.

Osim toga, korisno je imati informacije o strukturnoj formuli, čistoći tvari, stabilnosti u vodi i na svjetlosti, pK_a, P_{ow} i rezultate ispitivanja na laku biorazgradivost (vidjeti ispitnu metodu C.4.).

1.5. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju biti zadovoljeni sljedeći uvjeti:

— smrtnost u kontrolnoj skupini odnosno skupinama na kraju ispitivanja ne smije biti viša od 10 %,

— povećanje srednje mase riba u kontrolnoj skupini odnosno skupinama mora biti dovoljno veliko da se može utvrditi najmanja promjena brzine rasta koja se smatra značajnom. Prstenasti je test (2) pokazao da se kod kalifornijske pastrve srednja masa riba u kontrolnim skupinama u 28 dana mora povećati najmanje za pola (tj. 50 %) njihove početne srednje mase; npr. početna masa: 1 g/riba (= 100 %), konačna masa nakon 28 dana: ≥ 1,5 g/riba (≥ 150 %),

— u čitavom tijeku ispitivanja koncentracija otopljenog kisika mora iznositi barem 60 % vrijednosti zasićenja kisikom (ASV),

— razlike u temperaturi vode između ispitnih komora ne smiju niti u jednom trenutku tijekom ispitivanja biti veće od ± 1 °C; temperaturu vode treba održavati unutar utvrđenog područja za ispitnu vrstu u pitanju (Dodatak 1.) uz maksimalna odstupanja od 2 °C unutar tog područja.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Aparatura**

Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

— mjerači kisika i pH vrijednosti,

▼B

— oprema za određivanje tvrdoće vode i alkaliteta,

— prikladni uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti neprekidno praćenje,

— bazeni izrađeni od kemijski inertnog materijala i prikladne zapremnine s obzirom na preporučeno punjenje i gustoću nasada (vidjeti odjeljak 1.8.5. i Dodatak 1.),

— vaga prikladne točnosti (tj. točnost ± 0,5 %).

1.6.2. **Voda**

Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ± 0,5 pH jedinica. Preporučuje se tvrdoća vode iznad 140 mg/l (kao $CaCO_3$). Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane tvari), potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO_4), pesticida (npr. ukupni organofosforni i ukupni organoklorni pesticidi), ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba obavljati npr. svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Ako se dokaže da je kakvoća vode ujednačena tijekom najmanje jedne godine, određivanja se mogu prorijediti i razmaci povećati (npr. svakih šest mjeseci). Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2.

1.6.3. **Ispitne otopine**

Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem radne otopine.

Radnu otopinu treba po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane tvari u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. mješač ili ultrazvuk). Da bi se postigla prikladna koncentracija radne otopine mogu se koristiti kolone za zasićivanje („kolone za topljivost”).

Ponekad je za dobivanje prikladne koncentracije radne otopine potrebno koristiti otapala ili dispergente (sredstava za otapanje). Primjeri prikladnih otapala su aceton etanol, metanol, dimetilsulfoksid, dimetilformamid i trietilenglikol. Primjeri prikladnih dispergenata su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01 % i HCO-40. Kod primjene lako biorazgradivih sredstava (npr. aceton) i/ili visoko hlapljivih spojeva potreban je poseban oprez budući da oni kod protočnih ispitivanja mogu izazvati problem rasta bakterija. Ako se koristi sredstvo za otapanje, ono ne smije imati značajne učinke na riblji rast niti vidljive štetne učinke na juvenilne ribe, što mora potvrditi kontrola s otapalom bez ispitivane tvari.

▼B

Kod protočnih je ispitivanja za dopremanje niza koncentracija u ispitne komore potreban sustav koji stalno odmjerava i razrjeđuje radnu otopinu ispitivane tvari (npr. dozirna crpka, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač). Brzine protoka radnih otopina i vode za razrjeđivanje treba provjeravati u određenim razmacima tijekom ispitivanja, po mogućnosti jedanput dnevno, i one za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Prstenasti test (2) je pokazao da je za kalifornijsku pastrvu prihvatljiva dinamika izmjene vode od šest litara/g ribe/dan tijekom ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.8.2.2.).

Kod polustatičkih ispitivanja (s obnavljanjem) učestalost obnavljanja medija ovisi o stabilnosti ispitivane tvari, ali se u svakom slučaju preporučuje dnevno obnavljanje vode. Ako iz preliminarnih ispitivanja stabilnosti (vidjeti odjeljak 1.4.) proizlazi da koncentracija ispitivane tvari nije stabilna u razdoblju obnavljanja medija (tj. izvan raspona 80 – 120 % nazivne vrijednosti ili pada ispod 80 % izmjerene početne koncentracije), treba ramisliti o provedbi protočnog ispitivanja.

1.6.4. **Odabir vrste**

Preporučena vrsta za ovo ispitivanje je kalifornijska pastrva (*Oncorynchus mykiss*), budući da najveći dio iskustava počiva na prstenastom testu s tom vrstom (1)(2). Mogu se koristiti i druge dobro dokumentirane vrste, ali to može zahtijevati prilagodbu ispitnog postupka kako bi se osigurali prikladni ispitni uvjeti. Na primjer, postoje iskustva sa zebricom (*Danio rerio*) (3)(4) i medakom (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). U tom slučaju treba navesti razloge za odabir vrste i pokusnu metodu.

1.6.5. **Držanje riba**

Ribe za ispitivanje treba odabrati među populacijom iz istog nasada, a po mogućnosti i iz istog legla, koja je najmanje dva tjedna prije ispitivanja držana u uvjetima koji su slični ispitnim uvjetima u smislu kakvoće vode i osvjetljenja. Količina hrane koja se daje ribama u ukupnom razdoblju držanja i tijekom ispitivanja iznosi najmanje 2 % tjelesne mase dnevno, a po mogućnosti i 4 % tjelesne mase dnevno.

Nakon vremena prilagodbe od 48 sati bilježi se smrtnost, uz primjenu sljedećih kriterija:

— smrtnost iznad 10 % populacije u sedam dana: odbacuje se čitava serija,

— smrtnost između 5 i 10 % populacije: aklimatizacija se nastavlja još sedam dana; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana viša od 5 %, čitava se serija odbacuje,

— smrtnost ispod 5 % populacije u sedam dana: serija se prihvaća.

Ribe se ne smiju liječiti dva tjedna prije ispitivanja niti za vrijeme ispitivanja.

▼B

1.7. PLAN ISPITIVANJA

„Plan ispitivanja” odnosi se na odabir broja ispitnih koncentracija i razmaka među koncentracijama, broja bazena za svaku koncentraciju i broja riba po bazenu. U idealnom slučaju plan ispitivanja treba odabrati s obzirom na:

— cilj istraživanja,

— metodu statističke analize koja će se primijeniti,

— raspoloživost i troškove sredstava potrebnih za pokus.

U obrazloženju cilja treba po mogućnosti navesti s kojom statističkom snagom treba utvrditi razliku određenog reda veličine (npr. brzina rasta) ili, kao druga mogućnost, s kojom preciznošću treba procijeniti EC_x (npr. x = 10, 20 ili 30 i po mogućnosti ne manji od 10). Bez tog se ne može točno predvidjeti opseg istraživanja.

Važno je znati da plan ispitivanja koji je optimalan (tj. omogućuje najbolje iskorištenje sredstava) za jednu metodu statističke analize nije nužno optimalan za drugu. Stoga će preporučeni plan za procjenu LOEC/NOEC biti različit od preporučenog plana za regresijsku analizu.

U većini se slučajeva regresijskoj analizi daje prednost u odnosu na analizu varijance iz razloga koje navode Stephan i Rogers (8). Ipak, ako se ne pronađe prikladan regresijski model ($r^2 < 0,9$) treba koristiti NOEC/LOEC.

1.7.1. **Plan ispitivanja za regresijsku analizu**

Kod planiranja ispitivanja koje će se analizirati regresijskom analizom važno je uzeti u obzir sljedeće:

— Ispitne koncentracije moraju obavezno obuhvaćati koncentraciju s učinkom (npr. $EC_{10,20,30}$) i područje koncentracija unutar kojega je učinak ispitivane tvari od interesa. Najveća preciznost procjene koncentracija s učinkom postiže se kad se koncentracija s učinkom nalazi u sredini raspona koncentracija koje se ispituju. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona može pomoći u odabiru najprikladnijih ispitnih koncentracija.

— U interesu zadovoljavajućeg statističkog modeliranja, u ispitivanje treba uključiti najmanje jedan kontrolni bazen i još pet bazena s različitim koncentracijama. Prema potrebi, kada se koristi sredstvo za otapanje, uz ispitni niz treba predvidjeti i jednu kontrolu sa sredstvom za otapanje u najvišoj koncentraciji koja se ispituje (vidjeti odjeljak 1.8.3. i 1.8.4.).

— Može se koristiti odgovarajući geometrijski niz ili logaritamski niz (9) (vidjeti Dodatak 3.). Prednost se daje logaritamskom razmaku između ispitnih koncentracija.

▼B

— Ako je raspoloživo više od šest bazena, dodatne bazene treba koristiti za ponavljanja ili ih rasporediti unutar raspona koncentracija tako da se dobiju manji razmaci među njima. Obje su mjere jednako poželjne.

1.7.2. **Plan ispitivanja za procjenu NOEC/LOEC primjenom analize varijance (ANOVA)**

Poželjno je predvidjeti bazene ponavljanja pri svim koncentracijama; statističku analizu treba provesti na razini bazena (10). Bez ponavljanja nije moguće uzeti u obzir varijabilnost među bazenima osim one koja se može pripisati pojedinačnim ribama. Ipak, iskustvo je pokazalo (11) da je, u promatranom slučaju, varijabilnost među bazenima bila vrlo malena u odnosu na varijabilnost unutar bazena (tj. između riba). Stoga je provedba statističke analize na razini pojedinačnih riba relativno prihvatljiva alternativa.

Obično se koristi najmanje pet ispitnih koncentracija u geometrijskom nizu, po mogućnosti uz faktor koji nije viši od 3,2.

Općenito, kad se ispitivanje provodi s ponavljanjima, broj ponavljanja kontrolnih bazena, a time i broj riba, treba biti dvostruko veći od broja koji se koristi pri pojedinim ispitnim koncentracijama, koji mora biti jednak za sve koncentracije. (12)(13)(14). Naprotiv, ako nema ponavljanja, broj riba u kontrolnoj skupini treba biti jednak broju u pojedinim ispitnim koncentracijama.

Ako će se ANOVA temeljiti na bazenima, a ne na pojedinačnim ribama (što bi povlačilo za sobom pojedinačno obilježavanje riba ili korištenje „pseudo” specifičnih brzina rasta (vidjeti odjeljak 2.1.2.)), potreban je dovoljan broj ponavljanja bazena da se može odrediti standardna devijacija „bazena unutar koncentracija”). To znači da stupnjevi slobode za grešku kod analize varijance trebaju biti najmanje 5 (10). Ako se ponavljaju samo kontrole, postoji opasnost da će varijabilnost greške biti pristrana, jer ona može rasti sa srednjom vrijednošću brzine rasta u pitanju. Budući da brzina rasta uglavnom opada s povećanjem koncentracije, varijabilnost može biti precijenjena.

1.8. POSTUPAK

1.8.1. **Odabir i vaganje riba za ispitivanje**

Važno je da razlike u masi riba na početku ispitivanja budu što manje. Prikladni rasponi veličina za različite vrste preporučene za ovo ispitivanje navedeni su u Dodatku 1. U idealnom slučaju, pojedinačne mase riba u čitavoj seriji koja se koristi u ispitivanju trebale bi se na početku ispitivanja nalaziti u granicama ± 10 % aritmetičke srednje mase, a u svakom slučaju ne bi smjele prelaziti 25 %. Preporučuje se da se prije početka ispitivanja izvaže poduzorak riba radi procjene srednje mase.

▼B

Matičnoj populaciji treba uskratiti hranu 24 sata prije početka ispitivanja. Nakon toga ribe treba nasumično odabrati. Koristeći opći anestetik (npr. vodena otopina 100 mg/l trikain- metansulfonata (MS 222) neutraliziranog dodavanjem dva dijela natrijevog bikarbonata po dijelu MS 222), ribe (osušene upijajućim materijalom) treba pojedinačno izvagati da bi se odredila mokra masa s preciznošću navedenom u Dodatku 1. Ribe čija se masa nalazi unutar predviđenog raspona treba zadržati i nasumično ih rasporediti po ispitnim posudama. Treba zabilježiti ukupnu mokru masu riba u svakoj ispitnoj posudi. Uporaba anestetika i rukovanje (uključujući sušenje i vaganje) može kod juvenilnih riba izazvati stres i ozljede, posebno kod vrsta koje su malog rasta. Stoga juvenilnim ribama treba krajnje oprezno rukovati kako bi se izbjegao stres i ozljede životinja.

Ribe se ponovno važu 28. dana ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.8.6.). Ipak, ako se smatra da je potrebno preračunati količinu hrane, ribe se mogu ponovno izvagati 14. dana ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.8.2.3.). Za određivanje promjena veličine riba za potrebe prilagodbe količine hrane mogu se koristiti i druge metode, kao što je fotografska metoda.

1.8.2. **Uvjeti izlaganja**

1.8.2.1. *Trajanje*

Vrijeme ispitivanja je ≥ 28 dana.

1.8.2.2. *Količine punjenja i gustoće nasada*

Važno je da količina punjenja i gustoća nasada bude prilagođena ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 1.). Ako je gustoća nasada previsoka, dolazi do stresa uslijed prenapučenosti, što dovodi do smanjenja brzina rasta pa čak i bolesti. Preniska gustoća nasada može potaknuti teritorijalno ponašanje, što također može utjecati na rast. U svakom slučaju, količina punjenja treba biti dovoljno niska da se koncentracija otopljenog kisika može održati barem na razini 60 % ASV bez dozračivanja. Prstenasti je test (2) pokazao da je za kalifornijsku pastrvu prihvatljiva količina punjenja od 16 pastrva od 3 – 5 g na 40 litara. Preporučena dinamika izmjene vode tijekom ispitivanja je 6 litara/g ribe/dan.

1.8.2.3. *Hranjenje*

Ribe treba hraniti odgovarajućom hranom (Dodatak 1.), u dovoljnoj količini da se dobije prihvatljiva brzina rasta. Treba paziti da ne dođe do rasta mikroba i zamućenja vode. Kod kalifornijske pastrve te bi uvjete trebala zadovoljiti dnevna količina hrane od 4 % njihove tjelesne mase (2)(15)(16)(17). Dnevna se količina hrane može podijeliti u dva jednaka dijela i dati ribama u dva hranjenja na dan u razmaku od najmanje 5 sati. Količina se hrane temelji na početnoj ukupnoj masi riba u svakoj ispitnoj posudi. Ako se ribe ponovno važu 14. dana, količina se hrane može preračunati. Ribama treba uskratiti hranu 24 sata prije vaganja.

▼B

Nepojedena hrana i izmet se svakodnevno uklanjaju iz ispitnih posuda opreznim usisavanjem dna bazena.

1.8.2.4. *Svjetlost i temperatura*

Fotoperiod i temperaturu vode treba prilagoditi ribljoj vrsti (Dodatak 1.).

1.8.3. **Ispitne koncentracije**

U pravilu je potrebno pet koncentracija ispitivane tvari, bez obzira na plan ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.7.2.). U odabiru odgovarajućih ispitnih koncentracija može pomoći prethodno znanje o toksičnosti ispitivane tvari (npr. iz ispitivanja akutne toksičnosti i/ili istraživanja za određivanje raspona). Ako se koristi manje od pet koncentracija, treba navesti obrazloženje. Najviša ispitivana koncentracija ne smije biti viša od granice topljivosti tvari u vodi.

Ako se kao pomoć u pripremi radne otopine koristi sredstvo za otapanje, njegova konačna koncentracija ne smije biti viša od 0,1 ml/l i treba po mogućnosti biti jednaka u svim ispitnim posudama (vidjeti odjeljak 1.6.3.). Ipak, treba nastojati izbjeći korištenje takvih materijala gdje god je to moguće.

1.8.4. **Kontrole**

Broj kontrola s vodom za razrjeđivanje ovisi o planu ispitivanja (vidjeti odjeljke 1.7. – 1.7.2.). Ako se koristi sredstvo za otapanje, u ispitivanje treba uključiti isti broj kontrola sa sredstvom za otapanje.

1.8.5. **Učestalost analitičkog određivanja i mjerenja**

Koncentracije ispitivane tvari određuju se u redovitim razmacima tijekom ispitivanja (vidjeti dolje).

Kod protočnih ispitivanja brzine protoka sredstva za razrjeđivanje i radne otopine toksikanta treba provjeravati u određenim razmacima, po mogućnosti jedanput dnevno; one tijekom ispitivanja ne bi smjele odstupati više od 10 %. Ako se očekuje da će koncentracije ispitivane tvari biti u granicama ± 20 % nazivnih vrijednosti (tj. unutar područja 80 – 120 %; vidjeti odjeljke 1.6.2. i 1.6.3.), preporučuje se da se na početku ispitivanja, i zatim u tjednim razmacima, analiziraju barem najviše i najniže ispitne koncentracije. Kod ispitivanja gdje se ne očekuje da će koncentracija ispitivane tvari ostati u granicama ± 20 % nazivne vrijednosti (na temelju podataka o stabilnosti ispitivane tvari), potrebno je prema istom režimu analizirati sve ispitne koncentracije.

U slučaju polustatičkih ispitivanja (s obnavljanjem), ako se očekuje da će koncentracija ispitivane tvari ostati u granicama ± 20 % nazivnih vrijednosti, preporučuje se da se na početku istraživanja odmah nakon pripreme otopine i neposredno prije obnavljanja te u tjednim razmacima nakon tog analiziraju barem najviše i najniže ispitne koncentracije. Ako se ne očekuje da će koncentracija ispitivane tvari ostati u granicama ± 20 % nazivne vrijednosti, treba analizirati sve ispitne koncentracije prema istom režimu kao kod stabilnijih tvari.

▼B

Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Ipak, ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane tvari u otopini u čitavom tijeku ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nazivnim ili izmjerenim vrijednostima.

U pojedinim je slučajevima uzorke potrebno filtrirati (npr. uz primjenu veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati. Centrifugiranje je preporučeni postupak. Ipak, ako se ispitivani materijal ne adsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje.

Otopljeni kisik, pH i temperaturu treba mjeriti u svim ispitnim posudama tijekom ispitivanja. Ukupnu tvrdoću, alkalitet i salinitet (prema potrebi) treba mjeriti u kontrolnim posudama i jednoj posudi s najvišom koncentracijom. Otopljeni kisik i salinitet (prema potrebi) treba mjeriti barem tri puta (na početku, u sredini i na kraju ispitivanja). Kod polustatičkih se ispitivanja preporučuje češće mjerenje otopljenog kisika, po mogućnosti prije i nakon svakog obnavljanja vode ili barem jedanput tjedno. pH kod statičkog ispitivanja s obnavljanjem treba mjeriti na početku i na kraju svakog obnavljanja vode, a kod protočnih ispitivanja barem jedanput tjedno. Tvrdoću i alkalitet treba mjeriti jedanput kod svakog ispitivanja. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

1.8.6. **Promatranja**

Masa: na kraju ispitivanja treba izvagati sve preživjele ribe na bazi mokre mase (osušene upijajućim materijalom) bilo u skupinama po ispitnoj posudi ili pojedinačno. Vaganju životinja po ispitnim posudama daje se prednost u odnosu na pojedinačno vaganje, kod kojega je potrebno ribe pojedinačno obilježiti. U slučaju mjerenja pojedinačne mase radi određivanja pojedinačne specifične brzine rasta ribe, treba odabrati tehniku obilježavanja koja ne izaziva stres kod životinja (mogu se razmotriti sredstva obilježavanja različita od ledenog biljega npr. uporaba obojene tanke ribolovne strune).

U razdoblju ispitivanja ribe treba svakodnevno pregledavati i zabilježiti sve vanjske anomalije (kao što su krvarenje, promjena boje) i neuobičajena ponašanja. Treba evidentirati smrtnost i što prije ukloniti mrtve ribe. Mrtve se ribe ne nadomještaju jer su količina punjenja i gustoća nasada dovoljni da se izbjegnu učinci na rast uslijed promjena broja riba po bazenima. Ipak, potrebno je prilagoditi količinu hrane.

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. OBRADA REZULTATA

Preporučuje se da se u planiranje ispitivanja i analizu rezultata uključi statističar, budući da ova ispitna metoda pruža široke mogućnosti variranja koncepcije pokusa npr. u odnosu na broj ispitnih komora, broj ispitnih koncentracija, broj riba itd. S obzirom na raspoložive opcije u okviru plana ispitivanja, ovdje se ne navode posebne smjernice za statistički postupak.

▼B

Za ispitne posude gdje je smrtnost veća od 10 % ne treba računati brzine rasta. Ipak, stopu smrtnosti treba navesti za sve ispitne koncentracije.

Neovisno o tome koja se metoda koristi za analizu podataka, središnji pojam je specifična brzina rasta r između vremena t_1 i t_2. Ona se može definirati na više načina, ovisno o tome obilježavaju li se ribe pojedinačno ili ne i je li potreban prosjek bazena.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

gdje je:

r_1 = pojedinačna specifična brzina rasta ribe

r_2 = prosječna specifična brzina rasta po bazenu

r_3 = „pseudo” specifična brzina rasta

w_1, w_2 = masa određene ribe u vremenu t_1 odnosno t_2

$\log_e w_1$ = logaritam mase pojedinačne ribe na početku razdoblja istraživanja

$\log_e w_2$ = logaritam mase pojedinačne ribe na kraju razdoblja istraživanja

$\log_e w_1$ = prosjek logaritama vrijednosti w_1 za ribe u bazenu na početku razdoblja istraživanja

$\log_e w_2$ = prosjek logaritama vrijednosti w_2 za ribe u bazenu na kraju razdoblja istraživanja

t_1, t_2 = vrijeme (dani) na početku i kraju razdoblja istraživanja

r_1, r_2, r_3 mogu se izračunati za razdoblje od 0. – 28. dana te, prema potrebi (tj. ako je provedeno mjerenje 14. dana) za razdoblja od 0. – 14. i 14. – 28. dana.

2.1.1. **Regresijska analiza rezultata (modeliranje koncentracija-odgovor)**

Ova analitička metoda uspostavlja prikladan matematički odnos između specifične brzine rasta i koncentracije i tako omogućuje procjenu „EC_x” tj. svih potrebnih vrijednosti EC. Primjenom ove metode nije potrebno izračunavati r za pojedinačnu ribu (r_1), već se umjesto toga analiza može temeljiti na prosječnoj vrijednosti r po bazenima (r_2). Ovoj posljednjoj metodi se daje prednost. Ona je također primjerenija kad se koriste najsitnije vrste.

Za provjeru odnosa koncentracija-odgovor treba izraditi grafički prikaz specifičnih brzina rasta po bazenima (r_2) u ovisnosti o koncentraciji.

▼B

Treba odabrati prikladan model za izražavanje odnosa između r_2 i koncentracije i izbor potkrijepiti odgovarajućim argumentima.

Ako je broj preživjelih riba po bazenima različit, postupak prilagođavanja modela, bilo da je jednostavan ili nelinearan, treba ponderirati kako bi se uzela u obzir nejednakost u veličinama skupina.

Metoda prilagođavanja modela mora omogućiti procjenu npr. EC_{20} i njegovog raspršenja (bilo standardna greška ili interval pouzdanosti). Graf prilagođenog modela treba prikazati u odnosu prema podacima tako da bude vidljiva valjanost podudaranja (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analiza rezultata za procjenu LOEC-a**

Ako ispitivanje uključuje bazene ponavljanja pri svim koncentracijama, procjena LOEC-a može se temeljiti na analizi varijance (ANOVA) prosječne specifične brzine rasta po bazenima (vidjeti odjeljak 2.1.), nakon čega se uz pomoć prikladne metode (npr. Dunnettov ili Williamsov test (12)(13)(14)(21)) prosječni r za svaku koncentraciju uspoređuje s prosječnim r kontrola kako bi se odredila najniža koncentracija za koju je ta razlika značajna na razini vjerojatnosti 0,05. Ako nisu zadovoljene tražene pretpostavke za parametarske metode – nenormalna distribucija (npr. Shapiro-Wilkov test) ili heterogena varijanca (Bartlettov test), treba razmotriti mogućnost da se prije provedbe ANOVA-e podaci preoblikuju radi homogenizacije varijanci ili provesti ponderiranu ANOVA-u.

Ako ispitivanje ne uključuje ponavljanja pri svim koncentracijama, ANOVA na temelju bazena će biti neosjetljiva ili uopće neće biti moguća. U tom se slučaju, kao prihvatljivo kompromisno rješenje, ANOVA može temeljiti na „pseudo” specifičnoj brzini rasta r_3 za pojedinačne ribe.

Prosječni r_3 za svaku ispitnu koncentraciju se tada može usporediti s prosječnim r_3 kontrola. LOEC se zatim može odrediti kako je opisano gore. Treba imati na umu da ova metoda ne uzima u obzir nikakvu drugu varijabilnost između bazena osim one koja se može pripisati pojedinačnim ribama niti pruža bilo kakvu zaštitu od te varijabilnosti. Ipak, iskustvo je pokazalo (8) da je varijabilnost među bazenima vrlo malena u odnosu na varijabilnost unutar bazena (tj. između riba). Ako u analizu nisu uključene pojedinačne ribe, treba navesti metodu koja je korištena za određivanje stršećih vrijednosti i obrazložiti njezin odabir.

2.2. TUMAČENJE REZULTATA

Rezultate treba tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije toksikanta u ispitnim otopinama nalaze u blizini granice detekcije analitičke metode odnosno, kod poluststatičkih ispitivanja, ako se koncentracija ispitivane tvari smanji u vremenu između pripreme otopine i obnavljanja.

2.3. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

▼B

2.3.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući čistoću i analitičku metodu za kvantifikaciju ispitivane tvari, prema potrebi.

2.3.2. **Ispitne vrste:**

— znanstveni naziv (po mogućnosti),

— soj, veličina, dobavljač, moguća prethodna obrada itd.

2.3.3. **Ispitni uvjeti**

— ispitni postupak (npr. polustatički/obnavljanje, protočni, punjenje, gustoća nasada itd.),

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih posuda, ispitnih koncentracija i ponavljanja, broj riba po posudi),

— način pripreme radnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, treba ga navesti zajedno s koncentracijom),

— nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama i metoda kojom su dobivene, dokazi da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane tvari u pravoj otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, alkalitet, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni ogranski ugljik, suspendirana kruta tvar, salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala mjerenja,

— kakvoća vode unutar ispitnih posuda: pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija otopljenog kisika,

— detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta(-e) hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

2.3.4. **Rezultati:**

— dokazi da kontrole zadovoljavaju kriterij valjanosti za preživljavanje i podaci o smrtnosti u svim ispitnim koncentracijama,

— primijenjene statističko-analitičke tehnike, statistika na bazi ponavljanja ili riba, obrada podataka i obrazloženje primijenjenih tehnika,

— tablični podaci o pojedinačnim i srednjim masama riba 0., 14. (ako se mjeri) i 28. dana, vrijednosti prosječnih specifičnih brzina rasta po bazenima odnosno pseudospecifičnih brzina rasta (ovisno o slučaju) za razdoblje od 0. – 28. odnosno od 0. – 14. i 14. – 28. dana,

— rezultati statističke analize (tj. regresijska analiza ili ANOVA), po mogućnosti u tabličnom i grafičkom obliku, te LOEC ($p = 0,05$) i NOEC odnosno EC_x, po mogućnosti sa standardnim greškama,

▼B

— pojavnost neobičnih reakcija riba i svi vidljivi učinci ispitivane tvari.

3. REFERENCE

(1) Solbe J.F. de LG (1987) Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J., (1990) EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N.O. (1985) A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, str. 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B., (1991) Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, str. 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio., (1975) Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D., (1995) Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, str. 287-297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L., (1991) Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan C.E. and Rogers J.W., (1985) Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, str. 328-338.

(9) Environment Canada, (1992) Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, str. 81.

(10) Cox D.R., (1958) Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S., (1991) Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096-1121.

(13) Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, str. 482-491.

▼B

(14) Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, str. 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T., (1994) A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, str. 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W., (1990) The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, str. 33-41.

(17) Post, G., (1987) Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. str. 288.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J., (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, str. 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O., (1989) Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King T.J., (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. str. 12.

(21) Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, str. 510-531.

▼B

Dodatak 1.

PREPORUČENE RIBLJE VRSTE ZA ISPITIVANJE I PRIKLADNI ISPITNI UVJETI

Vrste	Preporučni raspon temperatura (°C)	Fotoperiod (sati)	Preporučeni raspon početnih masa riba (g)	Potrebna preciznost mjerenja	Količna punjenja (g/l)	Gustoća nasada (po litri)	Hrana	Trajanje ispitivanja (dani)
Preporučene vrste:								
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	12,5–16,0	12–16	1–5	na najbližih 100 g	1,2–2,0	4	Suha gotova hrana za mlađ salmonida	≥ 28
Druge dobro dokumentirane vrste:								
Danio rerio zebrica	21–25	12–16	0,050–0,100	na najbliži 1 mg	0,2–1,0	5–10	Živa hrana (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes (Medaka) medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	na najbliži 1 mg	0,2–1,0	5–20	Živa hrana (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

Dodatak 2.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Koncentracije
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼B

Dodatak 3.

Logaritamski niz prikladnih koncentracija za toksikološko ispitivanje (9)

Stupac (broj koncentracija između 100 i 10 ili između 10 i 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Iz stupca se može odabrati niz od pet (ili više) uzastopnih koncentracija. Srednje točke između koncentracija u stupcu (x) nalaze se u stupcu (2x + 1). Navedene vrijednosti koncentracija mogu predstavljati volumne ili masene postotke (mg/l ili µg/l). Vrijednosti se prema potrebi mogu množiti ili dijeliti bilo kojom potencijom broja 10. Stupac 1 može se koristiti ako postoji velika nesigurnost u pogledu razine toksičnosti.

▼B

C.15. TEST KRATKOTRAJNE TOKSIČNOSTI NA RIBAMA U STADIJU EMBRIJA I MLAĐI SA ŽUMANJČANOM VREĆICOM

1. METODA

Ova metoda ispitivanja kratkotrajne toksičnosti odgovara smjernici OECD TG 212 (1998.).

1.1. UVOD

Ovaj test kratkotrajne toksičnosti na stadiju ribljeg embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom je kratkotrajni test kojemu se podvrgavaju svježe oplođena jaja do kraja stadija sa žumanjčanom vrećicom. Za vrijeme ispitivanja embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom nije predviđeno hranjenje i stoga ispitivanje treba prekinuti dok se mlađ još hrani iz žumanjčane vrećice.

Test je namijenjem utvrđivanju letalnih, a u ograničenoj mjeri i subletalnih učinaka kemikalija na ispitivane stadije i vrstu. On bi mogao pružiti korisne informacije utoliko što bi (a) mogao poslužiti kao most između letalnih i subletalnih ispitivanja, (b) se mogao koristiti kao test pretraživanja za provedbu potpunog ispitivanja ranog životnog stadija ili ispitivanja kronične toksičnosti i (c) se mogao koristiti za ispitivanje vrsta gdje uzgojne tehnike još nisu dovoljno napredne da obuhvate razdoblje prijelaza s endogenog na egzogeno hranjenje.

Treba imati na umu da općenito samo ispitivanja koja uključuju sve stadije životnog ciklusa riba mogu dati točnu procjenu kronične toksičnosti kemikalija za ribe i da svako skraćeno izlaganje u smislu životnih stadija može smanjiti osjetljivost i tako potcijeniti kroničnu toksičnost. Stoga se očekuje da će ispitivanje provedeno na ribama u embrionalnom stadiju i stadiju žumanjčane vrećice biti manje osjetljivo od potpunog ispitivanja ranih životnih stadija, posebno u slučaju kemikalija visoke lipofilnosti (log P_{ow} > 4) i kemikalija sa specifičnim toksičnim djelovanjem. Ipak, kod kemikalija s nespecifičnim narkotičkim djelovanjem mogu se očekivati manje razlike u osjetljivosti između te dvije vrste ispitivanja (1).

Prije objave ovog testa najviše iskustava s ispitvanjem embrionalnog stadija i stadija žumanjčane vrećice bilo je vezano uz slatkovodnu ribu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Telostei, Cyprinidae* – narodno ime zebrica). Zbog tog su u Dodatku 1. navedene detaljnije smjernice za provođenje ispitivanja na toj vrsti. To ne isključuje korištenje ostalih vrsta s kojima također postoje iskustva (Tablica 1.).

1.2. DEFINICIJE

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC): najniža ispitana koncentracija kod koje je uočen značajan učinak ispitivane tvari (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a moraju imati jednak ili veći štetan učinak od onog koji je zabilježen pri LOEC-u.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC): ispitna koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

▼B

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Riblji embriji i mlađ sa žumanjčanom vrećicom izlažu se nizu koncentracija ispitivane tvari otopljene u vodi. U okviru protokola postoji mogućnost izbora polustatičkog ili protočnog postupka. Izbor ovisi o vrsti ispitivane tvari. Ispitivanje počinje polaganjem oplođenih jaja u ispitne komore i prestaje neposredno prije nego što ijedna ličinka u bilo kojoj ispitnoj komori u potpunosti apsorbira svoju žumanjčanu vrećicu odnosno prije nego što se u kontrolama zabilježi smrtnost zbog izgladnjelosti. Ocjenjuju se letalni i subletalni učinci i uspoređuju s kontrolnim vrijednostima kako bi se utvrdila najniža koncentracija s vidljivim učinkom, a time i najviša koncentracija bez vidljivog učinka. Oni se umjesto toga mogu analizirati i uz pomoć regresijskog modela radi procjene koncentracije koja bi izazvala učinak u određenom postotku (tj. LC/ECx gdje je x definirani % učinka).

1.4. PODACI O ISPITIVANOJ TVARI

Trebaju biti raspoloživi rezultati ispitivanja akutne toksičnosti (vidjeti metodu C.1.), po mogućnosti provedenog na vrsti odabranoj za ovo ispitivanje. Ti rezultati mogu biti korisni za odabir odgovarajućeg raspona ispitnih koncentracija kod ispitivanja ranih životnih stadija. Treba biti poznata topljivost u vodi (uključujući topljivost u ispitnoj vodi) i tlak pare ispitivane tvari. Osim toga, treba biti raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama s poznatom i dokumentiranom točnošću i granicom detekcije.

Informacije o ispitivanoj tvari koje mogu biti korisne kod određivanja ispitnih uvjeta su strukturna formula, čistoća tvari, stabilnost na svjetlosti, stabilnost u uvjetima ispitivanja, pKa, P_{ow} i rezultati ispitivanja na laku biorazgradivost (vidjeti metodu C.4.).

1.5. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju biti zadovoljeni sljedeći uvjeti:

— ukupno preživljavanje oplođenih jaja u kontrolama i posudama s otapalom bez ispitivane tvari (prema potrebi) mora biti veća ili jednaka graničnim vrijednostima definiranim u dodacima 2. i 3.,

— u čitavom tijeku ispitivanja koncentracija otopljenog kisika mora biti između 60 i 100 % vrijednosti zasićenja kisikom (ASV),

— razlike u temperaturi vode između ispitnih komora odnosno između uzastopnih dana ne smiju niti u jednom trenutku tijekom ispitivanja biti veće od ± 1,5 °C i trebaju biti unutar temperaturnih područja utvrđenih za ispitnu vrstu u pitanju (dodaci 2. i 3.).

▼B

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Ispitne komore**

Mogu se koristiti bilo kakve staklene ili druge kemijski inertne posude. Posude trebaju biti dovoljno velike da se mogu zadovoljiti količne punjenja (vidjeti odjeljak 1.7.1.2.). Preporučuje se da se ispitne posude nasumično smjeste unutar ispitnog prostora. Ako u laboratoriju postoje sustavni učinci koji se mogu kontrolirati formiranjem blokova, slučajnom bloknom rasporedu gdje su sve obrade prisutne u svim blokovima treba dati prednost u odnosu na potpuno slučajni raspored. Ako se primjenjuje blokni raspored, to treba uzeti u obzir kod kasnije analize podataka. Ispitne posude treba zaštititi od neželjenog uznemiravanja.

1.6.2. **Odabir ribljih vrsta**

Preporučene riblje vrste navedene su u tablici 1.A. To ne isključuje druge vrste (primjeri su navedeni u tablici 1.B), ali njihovo korištenje može zahtijevati prilagodbu ispitnog postupka kako bi se osigurali prikladni ispitni uvjeti. U tom slučaju treba navesti razloge za odabir vrste i pokusnu metodu.

1.6.3. **Držanje uzgojnih riba**

Podaci o prikladnim uvjetima za držanje uzgojnog jata mogu se naći u smjernici OECD TG 210 ([1]) i u referencama (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Rukovanje embrijima i ličinkama**

Kod izlaganja ispitnoj otopini embriji i ličinke se mogu položiti u manje posude smještene unutar glavne posude, koje imaju mrežaste stranice odnosno krajeve koji omogućuju protok otopine kroz posudu. Neturbulentno strujanje kroz male posude može se postići na način da se posude objese o polugu koja posude njiše gore-dolje, ali tako da ispitni organizmi ostanu čitavo vrijeme uronjeni; može se koristiti i sustav sifonskog ispiranja. Oplođena jaja salmonida mogu se položiti na stalke ili mreže s otvorima koji su dovoljno veliki da ličinke nakon što se izvale mogu kroz njih propasti. Kod polustatičkih ispitivanja sa svakodnevnim potpunim obnavljanjem medija (vidjeti stavak 1.6.6.) se za uklanjanje embrija i ličinki mogu koristiti Pasteurove pipete.

Ako se za držanje jaja unutar glavne ispitne posude koriste spremnici za jaja, rešetke ili mreže, njih treba ukloniti nakon što se ličinke izvale ([1]), osim mreža, koje treba zadržati kako bi se onemogućio bijeg riba. Ako ličinke treba premjestiti, one se ne smiju izložiti zraku; ribe se iz spremnika za jaja ne smiju vaditi mrežicom (takav oprez nije nužan kod nekih manje osjetljivih vrsta, kao što je šaran). Vrijeme prijenosa je različito ovisno o vrsti, s time da prijenos nije uvijek niti potreban. Kod polustatičkog se postupka mogu koristiti laboratorijske čaše ili plitki spremnici koji prema potrebi mogu biti opremljeni sitom blago izdignutim iznad dna čaše. Ako je zapremnina tih spremnika dovoljna da se zadovolje zahtjevi punjenja (vidjeti 1.7.1.2.), ličinke i embrije nije nužno premještati.

([1]) OECD. Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5. **Voda**

Prikladna ispitna voda je svaka voda koja ima kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje, kako je navedeno u Dodatku 4., i u kojoj je kontrolna vrijednost preživljavanja ispitne vrste barem na razini kako je navedeno u dodacima 2. i 3. Ona treba biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. pH treba održavati unutar područja ± 0,5 pH jedinica. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane tvari) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO_4), pesticida (npr. ukupni organofosforni i ukupni organoklorni pesticidi), ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba obavljati npr. svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Ako se dokaže da je kakvoća vode ujednačena tijekom najmanje jedne godine, određivanja se mogu prorijediti i razmaci povećati (npr. svakih šest mjeseci).

1.6.6. **Ispitne otopine**

Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem radne otopine.

Radnu otopinu treba po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane tvari u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. mješač ili ultrazvuk). Za postizanje prikladne koncentracije radne otopine mogu se koristiti kolone za zasićivanje („kolone za topljivost”). Uporabu otapala i dispergenata (sredstava za otapanje) treba što je moguće više izbjegavati; ipak, ti su spojevi u nekim slučajevima nužni da bi se dobila radna otopina prikladne koncentracije. Primjeri prikladnih otapala su aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. Primjeri prikladnih dispergenata su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01 % i HCO-40. Kod primjene lako biorazgradivih sredstava (npr. aceton) i/ili visoko hlapljivih spojeva potreban je poseban oprez budući da oni kod protočnih ispitivanja mogu izazvati problem rasta bakterija. Ako se koristi sredstvo za otapanje, ono ne smije imati značajan učinak na preživljavanje niti vidljiv štetni učinak na rane životne stadije, što mora potvrditi kontrola s otapalom bez ispitivane tvari. Ipak, treba nastojati izbjeći korištenje takvih materijala gdje god je to moguće.

Kod polustatičkog postupka mogu se koristiti dva različita postupka obnavljanja: i. pripreme se nove ispitne otopine u čistim posudama i preživjela jaja i ličinke se nježno prenesu u nove posude u maloj količini stare otopine, izbjegavajući izlaganje zraku, ili ii. ispitni organizmi se zadrže u posudama dok se dio ispitne vode (najmanje tri četvrtine) mijenja. Učestalost obnavljanja medija ovisi o stabilnosti ispitivane tvari, ali se u svakom slučaju preporučuje dnevno obnavljanje vode. Ako iz preliminarnih ispitivanja stabilnosti (vidjeti odjeljak 1.4.) proizlazi da koncentracija ispitivane tvari nije stabilna u razdoblju obnavljanja medija (tj. izvan raspona 80 – 120 % nazivne ili pada ispod 80 % izmjerene početne koncentracije), treba ramisliti o provedbi protočnog ispitivanja. U svakom slučaju treba paziti da se tijekom postupka obnavljanja vode ličinke ne izlože stresu.

▼B

Kod protočnih je ispitivanja za dopremanje niza koncentracija u ispitne komore potreban sustav koji stalno odmjerava i razrjeđuje radnu otopinu ispitivane tvari (npr. dozirna crpka, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač). Brzine protoka radnih otopina i vode za razrjeđivanje treba provjeravati u određenim razmacima, po mogućnosti jedanput dnevno, i one za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne bi smjele odstupati više od 10 %. Pokazalo se da je prikladna brzina protoka koja odgovara barem peterostrukom volumenu ispitne komore u 24 sata (2).

1.7. POSTUPAK

Korisne informacije o provedbi toksikoloških ispitivanja na ribljim embrijima i mlađi sa žumanjčanom vrećicom mogu se pronaći u literaturi, a neki od primjera nalaze se na popisu literature za ovaj tekst (7)(8)(9).

1.7.1. **Uvjeti izlaganja**

1.7.1.1. *Trajanje*

Ispitivanje treba po mogućnosti početi u roku 30 minuta nakon oplodnje jaja. Embriji se uranjaju u ispitnu otopinu prije ili što brže nakon početka stadija cijepanja blastodiska, a u svakom slučaju prije ulaska u stadij gastrule. Ako se jaja nabavljaju od trgovca, ispitivanje ponekad nije moguće započeti odmah nakon oplodnje. Budući da odgoda početka ispitivanja može ozbiljno utjecati na osjetljivost ispitivanja, ispitivanje se mora započeti u roku osam sati od oplodnje. S obzirom da se ličinke ne hrane u razdoblju izlaganja, ispitivanje treba prekinuti prije nego što ijedna ličinka u bilo kojoj ispitnoj komori u potpunosti apsorbira svoju žumanjčanu vrećicu odnosno prije nego što se u kontrolama zabilježi smrtnost zbog izgladnjelosti. Trajanje ovisi o vrsti koja se koristi. U dodacima 2. i 3. navedena su neka preporučena trajanja ispitivanja.

1.7.1.2. *Punjenje*

Broj oplođenih jaja na početku ispitivanja treba biti dovoljan da se zadovolje statistički zahtjevi. Jaja treba nasumično podijeliti po obradama koristeći najmanje 30 oplođenih jaja po koncentraciji, ravnomjerno raspoređenih (odnosno što ravnomjernije, budući da je kod nekih vrsta teško dobiti jednake serije) u najmanje tri paralelne ispitne komore (ponavljanja). Količna punjenja (biomasa po volumenu ispitne otopine) treba biti dovoljno niska da se koncentracija otopljenog kisika može održati barem na razini 60 % ASV-a bez dozračivanja. Preporučena količna punjenja kod protočnih ispitivanja iznosi najviše 0,5 g/l u 24 sata i najviše 5 g/l otopine u bilo kojem trenutku (2).

1.7.1.3. *Svjetlost i temperatura*

Fotoperiod i temperaturu ispitne vode treba prilagoditi ispitnoj vrsti (dodaci 2. i 3.). Prema potrebi treba dodati jednu ispitnu posudu za praćenje temperature.

▼B

1.7.2. **Ispitne koncentracije**

U pravilu je potrebno pet koncentracija ispitivane tvari koje se razlikuju za stalni faktor ne viši od 3,2. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija treba uzeti u obzir krivulju ovisnosti LC_{50} o vremenu izlaganja kod istraživanja akutne toksičnosti. U pojedinim se slučajevima može koristiti manje od pet koncentracija, primjerice kod graničnih ispitivanja, i uži interval koncentracija. Ako se koristi manje od pet koncentracija, treba navesti obrazloženje. Ne treba ispitivati koncentracije tvari iznad LC_{50} nakon 96 sati ili 100 mg/l, ovisno o tome što je manje. Tvari ne treba ispitivati iznad granice topljivosti u ispitnoj vodi.

Ako se kao pomoć u pripremi ispitnih otopina koristi sredstvo za otapanje (vidjeti odjeljak 1.6.6.), njegova konačna koncentracija u ispitnim posudama ne smije biti viša od 0,1 ml/l i mora biti jednaka u svim ispitnim posudama.

1.7.3. **Kontrole**

Uz ispitni niz treba provesti jednu kontrolu s vodom za razrjeđivanje (s ponavljanjima prema potrebi) i, ako se koristi sredstvo za otapanje, jednu kontrolu sa sredstvom za otapanje (s ponavljanjima prema potrebi).

1.7.4. **Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja**

Koncentracije ispitivane tvari određuju se u redovitim razmacima za vrijeme ispitivanja.

U slučaju polustatičkih ispitivanja, ako se očekuje da će koncentracija ispitivane tvari ostati u granicama ± 20 % nazivnih vrijednosti (tj. u rasponu 80 – 120 %; vidjeti odjeljke 1.4. i 1.6.6.), preporučuje se da se u pravilnim razmacima najmanje tri puta tijekom ispitivanja analiziraju barem najviša i najniža ispitna koncentracija, i to odmah nakon pripreme i neposredno prije obnavljanja (tj. analize treba napraviti na uzorku iz iste otopine – odmah nakon pripreme i kod obnavljanja).

Kod ispitivanja gdje se ne očekuje da će koncentracija ispitivane tvari ostati u granicama ± 20 % nazivne vrijednosti (na temelju podataka o stabilnosti ispitivane tvari), potrebno je analizirati sve ispitne koncentracije odmah nakon pripreme i prije obnavljanja prema istom režimu (tj. najmanje tri puta tijekom ispitivanja u pravilnim razmacima). Određivanje koncentracija ispitivane tvari prije obnavljanja treba provesti samo na jednoj posudi po ispitnoj koncentraciji. Između dva određivanja ne smije proći više od sedam dana. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Ipak, ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane tvari u otopini u čitavom tijeku ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima.

Kod protočnih ispitivanja treba koristiti sličan režim uzorkovanja kao što je opisano za polustatička ispitivanja (s time da u ovom slučaju ne vrijedi mjerenje „starih” otopina). Ipak, ako ispitivanje traje duže od sedam dana, dobro je povećati broj uzorkovanja u prvom tjednu (npr. tri seta mjerenja) kako bi se provjerila stabilnost ispitnih koncentracija.

▼B

Uzorci se ponekad moraju centrifugirati ili filtrirati (npr. uz primjenu veličine pora 0,45 μm). Ipak, čini se da se ni filtracijom niti centrifugiranjem ne može uvijek postići odvajanje bioraspoloživе frakcije ispitivane tvari od one koja nije bioraspoloživa; stoga uzorke nije potrebno podvrgavati tim postupcima.

Otopljeni kisik, pH i temperaturu treba mjeriti u svim ispitnim posudama tijekom ispitivanja. Ukupnu tvrdoću i salinitet (prema potrebi) treba mjeriti u kontrolnim posudama i jednoj posudi s najvišom koncentracijom. Otopljeni kisik i salinitet (prema potrebi) treba mjeriti barem tri puta (na početku, u sredini i na kraju ispitivanja). Kod polustatičkih se ispitivanja preporučuje češće mjerenje otopljenog kisika, po mogućnosti prije i nakon svakog obnavljanja vode ili barem jedanput tjedno. pH kod polustatičkog ispitivanja treba mjeriti na početku i na kraju svakog obnavljanja vode, a kod protočnih ispitivanja barem jedanput tjedno. Tvrdoću treba mjeriti jedanput kod svakog ispitivanja. Temperaturu treba mjeriti dnevno i po mogućnosti neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

1.7.5. **Promatranja**

1.7.5.1. *Stadij embrionalnog razvoja*

Embrionalni stadij (tj. stadij gastrule) na početku izlaganja ispitivanoj tvari treba što preciznije provjeriti. To se može učiniti pomoću reprezentativnog uzorka jajašaca koja su na prikladan način konzervirana i očišćena. Opis i prikaz embrionalnog stadija može se pogledati i u literaturi (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. *Valjenje i preživljavanje*

Valjenje i preživljavanje treba promatrati najmanje jedanput dnevno i relevantne brojke dokumentirati. Na početku ispitivanja poželjna su i češća promatranja (npr. svakih 30 minuta tijekom prva tri sata), budući da u nekim slučajevima vremena preživljavanja mogu biti značajnija od samog broja smrti (npr. u slučaju akutnih toksičnih učinaka). Mrtve embrije i ličinke treba ukloniti čim se uoče, budući da se oni mogu brzo raspasti. Kod uklanjanja mrtvih jedinki nužan je krajnji oprez kako bi se izbjegli udarci i fizičko ozljeđivanje susjednih jaja/ličinki, koji su izuzetno nježni i osjetljivi. Kriteriji za utvrđivanje smrti razlikuju se ovisno o životnom stadiju:

— **kod jajašaca:** posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bijelkasto-mutnim izgledom,

— **kod embrija:** odsutnost kretanja tijela i/ili odsutnost bila i/ili mutno obojenje kod vrsta čiji su embriji inače prozirni,

— **kod ličinki:** nepomičnost i/ili odsutnost pokreta disanja i/ili odsutnost bila i/ili bijela mutna boja središnjeg živčanog sustava i/ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje.

▼B

1.7.5.3. *Neuobičajeni izgled*

Broj ličinki kod kojih su vidljive anomalije u obliku tijela i/ili pigmentacija kao i stadij apsorpcije žumanjčane vrećice treba bilježiti u primjerenim razmacima, ovisno o trajanju ispitivanja i vrsti opisane anomalije. Važno je napomenuti da je pojava abnormalnih embrija i ličinki prirodna i da ih kod nekih vrsta u kontroli odnosno kontrolama može biti i više postotaka. Abnormalne životinje treba ukloniti iz ispitnih posuda tek nakon smrti.

1.7.5.4. *Neuobičajeno ponašanje*

Anomalije, npr. hiperventilacija, nekoordinirano plivanje i atipična mirnoća, treba bilježiti u primjerenim razmacima, ovisno o trajanju ispitivanja. Ako se uoče takvi učinci, oni mogu, iako ih je teško kvantificirati, pomoći u tumačenju podataka o smrtnosti, tj. pružiti informacije o načinu toksičnog djelovanja tvari.

1.7.5.5. *Dužina*

Preporučuje se da se na kraju ispitivanja izmjere pojedinačne dužine; može se koristiti standardna, vilična ili ukupna dužina. Međutim, u slučaju truleži repne peraje ili erozije peraje treba koristiti standardne dužine. Općenito, kod dobro provedenih ispitivanja koeficijent varijacije dužine među ponavljanjima u kontrolama trebao bi biti ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Masa*

Na kraju ispitivanja mogu se izmjeriti pojedinačne mase; suhoj masi (24 sata na 60 °C) se daje prednost u odnosu na mokru masu (osušeno upijajućim materijalom). Općenito, kod dobro provedenih ispitivanja koeficijent varijacije mase među ponavljanjima u kontrolama trebao bi biti ≤ 20 %.

Na temelju tih zapažanja mogu se dobiti svi ili neki od sljedećih podataka koji se koriste u statističkoj analizi:

— kumulativna smrtnost,

— broj zdravih ličinki na kraju ispitivanja,

— vrijeme do početka valjenja i kraja valjenja (tj. 90 % valjenja u svakom ponavljanju),

— broj izvaljenih ličinki svakog dana,

— dužina (i masa) preživjelih životinja na kraju ispitivanja,

— broj deformiranih ličinki odnosno broj ličinki neuobičajenog izgleda,

— broj ličinki koje pokazuju neuobičajeno ponašanje.

▼B

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. OBRADA REZULTATA

Preporučuje se da se u planiranje ispitivanja i analizu rezultata uključi statističar, budući da ova metoda pruža široke mogućnosti variranja koncepcije pokusa npr. u odnosu na broj ispitnih komora, broj ispitnih koncentracija, početni broj oplođenih jaja i mjerene parametre. S obzirom na raspoložive opcije u okviru plana ispitivanja, ovdje se ne navode posebne smjernice u pogledu statističkih postupaka.

Ako se procjenjuje LOEC/NOEC, potrebno je analizirati varijacije unutar svakog seta ponavljanja primjenom analize varijance (ANOVA) ili tablica kontingencije. Za višestruku usporedbu rezultata pojedinačnih koncentracija i kontrola može biti korisna Dunnettova metoda (12)(13). Postoje i drugi korisni primjeri (14)(15). Potrebno je izračunati i navesti veličinu učinka koja se može utvrditi primjenom ANOVA-e ili drugih postupaka (tj. snaga testa). Valja napomenuti da zapažanja navedena u odjeljku 1.7.5.6. nisu sva prikladna za statističku analizu uz pomoć ANOVA-e. Primjerice, kumulativna smrtnost i brojevi zdravih ličinki na kraju ispitivanja mogu se analizirati metodama vjerojatnosti.

Ako se procjenjuju LC/EC_x, relevantnim podacima treba prilagoditi odgovarajuću krivulju odnosno krivulje, npr. logističku krivulju, primjenom statističke metode kao što je metoda najmanjih kvadrata ili nelinearna metoda najmanjih kvadrata. Krivulja(-e) treba parametrizirati tako da se relevantni LC/EC_x i njegova standardna greška može izravno procijeniti. To u velikoj mjeri olakšava izračun granica pouzdanosti oko LC/EC_x. Treba navesti dvostranu pouzdanost na razini 95 %, osim ako postoje dobri razlozi za primjenu drugih razina pouzdanosti. Poželjno je da postupak prilagođavanja obuhvaća metodu za ocjenjivanje značajnosti nepodudaranja („lack of fit”). Mogu se koristiti grafičke metode prilagođavanja krivulje. Regresijska analiza prikladna je za sva zapažanja navedena u odjeljku 1.7.5.6.

2.2. TUMAČENJE REZULTATA

Rezultate treba tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije toksikanta u ispitnim otopinama nalaze u blizini granice detekcije analitičke metode. Oprez je nužan i kod tumačenja rezultata za koncentracije iznad topljivosti tvari u vodi.

2.3. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

2.3.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući čistoću i analitičku metodu za kvantifikaciju ispitivane tvari (prema potrebi).

▼B

2.3.2. **Ispitne vrste:**

— znanstveni naziv, soj, broj roditeljskih riba (tj. koliko je ženki upotrijebljeno kako bi se osigurao potreban broj jajašaca za ispitivanje), izvor i metoda skupljanja oplođenih jaja i kasnije rukovanje.

2.3.3. **Ispitni uvjeti**

— ispitni postupak (npr. polustatički ili protočni, vrijeme od oplodnje do početka ispitivanja, punjenje itd.),

— fotoperiod(i),

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora i ponavljanja, broj embrija po ponavljanju),

— način pripreme radnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, treba ga navesti zajedno s koncentracijom),

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene vrijednosti, njihove srednje vrijednosti i standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su dobivene; ako je ispitivana tvar topljiva u vodi u koncentracijama ispod ispitanih, treba pružiti dokaz da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane tvari u otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik, suspendirana kruta tvar, salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,

— kakvoća vode u ispitnim posudama: pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija otopljenog kisika.

2.3.4. **Rezultati:**

— rezultati preliminarnih istraživanja stabilnosti ispitivane tvari,

— dokaz da kontrole zadovoljavaju opći standard prihvatljivosti stopa preživljavanja za ispitnu vrstu (dodaci 2. i 3.),

— podaci o smrtnosti/preživljavanju u embrionalnom stadiju i stadiju ličinke i ukupna smrtnost/preživljavanje,

— broj dana do valjenja i broj izvaljenih životinja,

— podaci o dužini (i masi),

— pojavnost i opis morfoloških anomalija, ako ih ima,

— pojavnost i opis učinaka na ponašanje, ako ih ima,

— statistička analiza i obrada podataka,

— kod ispitivanja koja se analiziraju pomoću ANOVA-e, najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) pri $p = 0,05$ i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor, uključujući opis primijenjenih statističkih postupaka i naznaku koju je veličinu učinka bilo moguće utvrditi,

▼B

— kod ispitivanja koja se analiziraju regresijskim tehnikama, LC/EC_x i intervali pouzdanosti te graf prilagođenog modela koji je korišten za izračun,

— obrazloženje svih odstupanja od ove ispitne metode.

3. **REFERENCE**

(1) Kristensen P., (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, str. 60. June 1990.

(2) ASTM (1988) Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. str. 26

(3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A., (1975) Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. str. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. and Jones B.R., (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures str. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, str. 121-173.

(6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, str. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T., (1987) Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, str. 61-71.

(8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G., (1985) Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, str. 807-821.

(9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, str. 129-145.

(10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969) Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976) The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. str. 36.

(12) Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, str. 482-491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G., (1980) Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J., (1990) Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, str. 321-334.

(16) Environment Canada., (1992) Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, str. 81.

(17) Dave G. and Xiu R., (1991) Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, str. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G., (1993) The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P., (1995) Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, str. 19-28.

(20) US EPA, (1991) Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991) Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D., (1991) Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, str. 1189-1203.

(23) Calow P., (1993) Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K., (1985) Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, str. 280.

(25) Blaxter J.H.S., (1988) Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, str. 1-58.

Tablica 1.A

Preporučene riblje vrste za ispitivanje

SLATKOVODNE
Oncorhynchus mykiss
Kalifornijska pastrva (9)(16)
Danio rerio
Zebrica (7)(17)(18)
Cyprinus caprio
Šaran (8)(19)
Oryzias latipes
Medaka (20)(21)
Pimephales promelas
Debeloglava gaovica (8)(22)

▼B

Tablica 1.B

Primjeri drugih dobro dokumentiranih vrsta koje su također korištene

SLATKOVODNE	MORSKE
Carassius auratus Zlatna ribica (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Plavoškrga sunčanica (8)	*Clupea harengus* Haringa (24)(25)
	Gadus morhua Bakalar (24)(25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23)(24)(25)

▼B

Dodatak 1.

SMJERNICE ZA PROVOĐENJE TOKSIKOLOŠKOG ISPITIVANJA NA EMBRIJIMA I MLAĐI SA ŽUMANJČANOM VREĆICOM ZEBRICE (*BRACHIDANYIO RERIO*)

UVOD

Zebrica potječe s obale Coromandel u Indiji, gdje nastanjuje brzace. To je rasprostranjena akvarijska riba iz porodice šarana i informacije o njezinom održavanju i uzgoju mogu se naći u standardnim priručnicima o tropskim ribama. O njezinoj biologiju i uporabi u ribarstvenim istraživanjima govori Laale (1).

Ova riba rijetko prelazi dužinu od 45 mm. Tijelo joj je cilindrično sa 7 – 9 tamnoplavih vodoravnih srebrenkastih pruga. Te se pruge protežu do repne i podrepne peraje. Leđa su joj maslinastozelena. Mužjaci su vitkiji od ženki. Kod ženki je srebrena boja izraženija i trbuh im je nadut, posebno prije mriještenja.

Odrasle ribe mogu podnijeti velike fluktuacije u temperaturi, pH i tvrdoći. Međutim, da bi se dobile zdrave ribe koje daju kvalitetna jaja, treba osigurati optimalne uvjete.

Kod mriještenja mužjak snubi ženku i nasrće na nju, a čim ona izbaci jaja, on ih oplođava. Jaja, koja su prozirna i neljepljiva, padaju na dno, gdje ih mogu pojesti roditelji. Na mriještenje utječe svjetlost. Ako je jutarnja svjetlost dostatna, ribe se obično mrijeste u ranim jutarnjim satima nakon svitanja.

Ženka može proizvesti serije od po nekoliko stotina jaja u tjednim razmacima.

UVJETI ZA RODITELJSKE RIBE, REPRODUKCIJU I RANE ŽIVOTNE STADIJE

Odabere se odgovarajući broj zdravih riba i drži u prikladnoj vodi (npr. Prilog 4.) najmanje dva tjedna prije planiranog mriještenja. Skupinu riba treba pustiti da se barem jedanput omrijesti prije nego što daju jaja koja će se koristiti za ispitivanje. Gustoća riba u tom razdoblju ne smije prijeći 1 gram ribe po litri. Ako se voda redovito mijenja odnosno ako se koriste sustavi za pročišćavanje, gustoća može biti i veća. Temperaturu u bazenima treba održavati na 25 ± 2 °C. Ribama treba osigurati raznovrsnu ishranu, koja se može sastojati npr. od odgovarajuće suhe industrijske hrane, živih novoizvaljenih artemija, trzalaca, dafnija, bijelih crvi (*Enchytraeidae*).

U nastavku su opisana dva postupka, koji su u praksi dali dostatne serije zdravih oplođenih jaja za provedbu ispitivanja:

i. 8 ženki i 16 mužjaka stavi se u bazen s 50 litara vode za razrjeđivanje, zakloni od izravne svjetlosti i ostavi tako najmanje 48 sati, izbjegavajući svako uznemiravanje. U poslijepodnevnim satima na dan prije početka ispitivanja na dno se akvarija stavi podložak za polijeganje jaja. Podložak za polijeganje jaja sastoji se od okvira (od pleksi-stakla ili drugog prikladnog materijala) visine 5 – 7 cm na čiji je vrh pričvršćena gruba mreža 2 – 5 mm, dok se na dnu nalazi fina mreža 10 – 30 μm. Određeni broj „stabala za mriještenje”, koja se sastoje od nesukanog najlonskog užeta, pričvrsti se na grubu mrežu na okviru. Ribe se ostave u mraku 12 sati, nakon čega se uključi slabo svjetlo koje potiče mriještenje. Dva do četiri sata nakon mriještenja ukloni se podložak i skupe jaja. Podložak za polijeganje jaja sprečava ribe da pojedu jaja i istodobno olakšava skupljanje jaja. Skupina riba mora imati barem jedan mrijest prije mrijesta koji se koristi u ispitivanju.

▼B

ii. 5 do 10 mužjaka i ženki drži se pojedinačno najmanje dva tjedna prije predviđenog mriještenja. Nakon 5 – 10 dana trbusi ženki se napuhnu i njihove genitalne papile postanu vidljive. Mužjaci nemaju papile. Mriještenje se provodi u mrijesnim bazenima koji imaju lažno mrežasto dno (kao gore). Bazen se napuni vodom za razrjeđivanje, tako da dubina vode iznad mreže bude 5 – 10 cm. U bazen se stavi jedna ženka i dva mužjaka dan prije predviđenog mriještenja. Temperatura vode se postupno povisi za jedan stupanj iznad temperature aklimatizacije. Isključi se svjetlo i bazen ostavi što je moguće više u miru. Ujutro se uključi slabo svjetlo koje potiče mriještenje. Nakon dva do četiri sata ribe se uklone i skupe se jaja. Ako su potrebne veće serije jaja koje se ne mogu dobiti od jedne ženke, može se postaviti dovoljan broj paralelnih mrijesnih bazena. Bilježenjem pojedinačne reproduktivne uspješnosti ženki prije ispitivanja (veličina serije i kakvoća) mogu se za uzgoj odabrati ženke koje su reproduktivno najuspješnije.

Jaja se prenose u ispitne posude pomoću staklenih cjevčica (čiji unutanji promjer ne smije biti manji od 4 mm) koje su opremljene fleksibilnom pumpicom. Količina vode koja se prenosi s jajima treba biti što manja. Jaja su teža od vode i propadaju kroz cjevčicu. Treba paziti da jaja (i ličinke) ne dođu u dodir sa zrakom. Mikroskopskim pregledom uzor(a)ka serije odnosno serija treba se uvjeriti da u prvim razvojnim stadijima nema nepravilnosti. Dezifinciranje jaja nije dopušteno.

Stopa smrtnosti jaja najviša je unutar prva 24 sata nakon oplodnje. U tom se razdoblju često može uočiti smrtnost 5 – 40 %. Do degeneracije jaja dolazi zbog neuspješne oplodnje ili grešaka u razvoju. Čini se da kakvoća serije jaja ovisi o ženki, budući da neke ženke stalno poliježu jaja dobre kakvoće, a druge nikada. Osim toga, brzina razvoja i stopa valjenja razlikuju se od serije do serije. Uspješno oplođena jaja i ličinke sa žumanjčanom vrećicom dobro preživljavaju, uglavnom iznad 90 %. Na 25 °C do valjenja dolazi tri do pet dana nakon oplodnje, a žumanjčana se vrećica apsorbira približno 13 dana nakon oplodnje.

Embrionalni razvoj su dobro definirali Hisaoka i Battle (2). Zahvaljujući prozirnosti jaja i ličinki može se pratiti razvoj riba i uočiti prisutnost malformacija. Neoplođena se jaja mogu razlikovati od oplođenih oko četiri sata nakon mriještenja (3). Za ovaj pregled jaja i ličinke treba staviti u ispitne posude male zapremnine i proučiti pod mikroskopom.

Ispitni uvjeti koji se odnose na rane životne stadije navedeni su u Dodatku 2. Optimalne vrijednosti pH i tvrdoće vode za razrjeđivanje su 7,8 odnosno 250 mg $CaCO_3$/l.

IZRAČUNI I STATISTIKA

Preporučuje se pristup u dvije faze. Prvo se provede statistička analiza podataka o smrtnosti, razvojnim anomalijama i vremenu valjenja. Zatim se statistički ocijeni dužina tijela za koncentracije kod kojih nisu otkriveni štetni učinci niti na jedan od ovih parametara. Ovaj je pristup preporučljiv, budući da toksikant može selektivno ubijati manje ribe, odgoditi vrijeme valjenja i izazvati grube malformacije i tako dovesti do pristranosti u mjerenjima dužine. Nadalje, potrebno je izmjeriti približno isti broj riba u svakoj obradi kako bi se osigurala valjanost statistike ispitivanja.

▼B

ODREĐIVANJE LC_{50} I EC_{50}

Izračuna se postotak preživjelih jaja i ličinki i ispravi za smrtnost u kontroli u skladu s Abbottovom formulom (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

gdje je:

P = ispravljeni % preživljavanja

P' = % preživljavanja u ispitnoj koncentraciji

C = % preživljavanja u kontroli

Ako je to moguće, LC_{50} se određuje prikladnom metodom na kraju ispitivanja.

Ako se u statistiku EC_{50} žele uključiti morfološke anomalije, odgovarajuće se smjernice mogu pronaći kod Stephana (5).

PROCJENA LOEC-a I NOEC-a

Cilj ispitivanja jaja i mlađi sa žumanjčanom vrećicom je usporediti koncentracije s učinkom s kontrolom tj. odrediti LOEC. Stoga je potrebno primijeniti postupke višestruke usporedbe (6)(7)(8)(9)(10).

REFERENCE

(1) Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, str. 121-173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I., (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, str. 311.

(3) Nagel R., (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, str. 173-181.

(4) Finney D.J., (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, str. 1-333.

(5) Stephan C.E., (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, str. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096-1121.

(7) Dunnett C.W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, str. 482-491.

(8) Williams D.A., (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, str. 103-117.

(9) Williams D.A., (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, str. 519-531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J., (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

Dodatak 2.

ISPITNI UVJETI, TRAJANJE I KRITERIJI PREŽIVLJAVANJA ZA PREPORUČENE VRSTE

Vrste	Temp. (°C)	Salinitet (0/00)	Fotoperiod (sati)	Trajanje stadija (dani)		Tipično trajanje ispitivanja	Preživljavanje u kontroli (najmanje %)	
				Embrij	Žumanjčana vrećica		Uspješnost valjenja	Nakon valjenja
SLATKOVODNE								
Brachydanio rerio Zebrica	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 5 dana nakon valjenja (8 – 10 dana)	80	90
Oncorhynchus mykiss Kalifornijska pastrva	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30 – 35	25 – 30	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 20 dana nakon valjenja (50 – 55 dana)	66	70
Cyprinus caprio Šaran	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 4 dana nakon valjenja (8 – 9 dana)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 5 dana nakon valjenja (13 – 16 dana)	80	80
Pimephales promelas Debeloglava gaovica	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 4 dana nakon valjenja (8 – 9 dana)	60	70

(1) Za embrije.
(2) Za ličinke.
(a) Tama za embrije i ličinke do jednog tjedna nakon valjenja, osim kod pregledavanja. Zatim prigušeno svjetlo u čitavom tijeku ispitivaja.

▼B

Dodatak 3.

Ispitni uvjeti, trajanje i kriteriji preživljavanja za ostale dobro dokumentirane vrste

Vrste	Temp. (°C)	Salinitet (0/00)	Fotoperiod (sati)	Trajanje stadija (dani)		Tipično trajanje ispitivanja na embrijima i mlađi sa žumanjčanom vrećicom	Preživljavanje u kontroli (najmanje %)	
				Embrij	Žumanjčana vrećica		Uspješnost valjenja	Nakon valjenja
SLATKOVODNE								
Carassius auratus Zlatna ribica	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 4 dana nakon valjenja (7 dana)	—	80
Lepomis macrochirus Plavoškrga sunčanica	21 ± 1	—	16	3	> 4	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 4 dana nakon valjenja (7 dana)	—	75
MORSKE								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 5 dana nakon valjenja (6 – 7 dana)	80	60
Clupea harengus Haringa	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 3 dana nakon valjenja (23 – 27 dana)	60	80
Gadus morhua Bakalar	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 3 dana nakon valjenja (18 dana)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 21	15 – 30	12	—	—	Što prije nakon oplodnje (rani stadij gastrule) do 4/7 dana nakon valjenja (28 dana)	> 75	80

▼B

Dodatak 4.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Koncentracije
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus polikloririrani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼B

C.16. MEDONOSNE PČELE – ISPITIVANJE AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI

1. METODA

Ova metoda ispitivanja akutne toksičnosti odgovara smjernici OECD TG 213 (1998.).

1.1. UVOD

Ovaj toksikološki test je laboratorijska metoda namijenjena ocjenjivanju akutne oralne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih kemikalija za odrasle medonosne pčele radilice.

Prilikom ocjenjivanja toksičnih svojstava tvari ponekad je potrebno odrediti akutnu oralnu toksičnost na medonosnim pčelama, npr. kad je vjerojatno izlaganje pčela kemikaliji. Test akutne oralne toksičnosti provodi se kako bi se odredila svojstvena toksičnost pesticida i drugih kemikalija za pčele. Na temelju rezultata ovog testa treba definirati potrebu za daljnjim ocjenjivanjem. Ova se metoda može koristiti posebno u stupnjevitim programima za ocjenjivanje opasnosti pesticida za pčele, koji se temelje na postupnom prijelazu s laboratorijskih toksikoloških ispitivanja na poluterenske i terenske pokuse (1). Pesticidi se mogu ispitivati kao aktivne tvari (a.s.) ili kao formulirani proizvodi.

Za provjeru osjetljivosti pčela i preciznosti ispitnog postupka treba koristiti toksični standard.

1.2. DEFINICIJE

Akutna oralna toksičnost: štetni učinak koji nastupa unutar najviše 96 sati nakon oralne primjene jedne doze ispitivane tvari.

Doza: unesena količina ispitivane tvari. Doza se izražava kao masa (μg) ispitivane tvari po ispitnoj životinji (μg/pčela). Stvarna doza za svaku pojedinu pčelu ne može se izračunati budući da se pčele hrane skupno, ali se može procijeniti prosječna doza (ukupno unesena ispitivana tvar/broj ispitivanih pčela u jednom kavezu).

Oralni LD_{50} (medijan letalne doze): statistički izvedena pojedinačna doza tvari koja može izazvati smrt 50 % životinja kod primjene oralnim putem. Vrijednost LD_{50} izražava se u μg ispitivane tvari po pčeli. Kod pesticida ispitivana tvar može biti aktivna tvar (a.s.) ili formulirani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih tvari.

Smrtnost: životinja se bilježi kao mrtva kad je potpuno nepomična.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Odrasle medonosne pčele radilice (*Apis mellifera*) izlažu se nizu doza ispitivane tvari dispergirane u šećernoj otopini. Pčele se zatim hrane istom hranom bez ispitivane tvari. Smrtnost se bilježi dnevno tijekom najmanje 48 sati i uspoređuje s kontrolnim vrijednostima. Ako se stopa smrtnosti poveća između 24 i 48 sati, a kontrolna smrtnost ostane na prihvaćenoj razini tj. $\leq$ 10 %, vrijeme ispitivanja treba produžiti na najviše 96 sati. Rezultati se analiziraju kako bi se izračunao LD_{50} nakon 24 i 48 sati te, u slučaju produžetka istraživanja, nakon 72 i 96 sati.

▼B

1.4. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

— prosječna smrtnost u ukupnom broju kontrola na kraju ispitivanja ne smije biti viša od 10 %,

— LD_{50} toksičnog standarda odgovara utvrđenom području.

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Skupljanje pčela**

Treba koristiti mlade odrasle pčele radilice iste pasmine tj. pčele iste dobi, stanja uhranjenosti itd. Pčele trebaju potjecati iz dobro hranjenih, zdravih zajednica s maticom, u kojima nema pojava bolesti (u mjeri u kojoj je to moguće) i čija je povijest i fiziološki status poznat. Treba ih skupiti u jutro uporabe ili večer prije ispitivanja i držati u ispitnim uvjetima do sljedećeg dana. Prikladne su pčele skupljene s okvira bez legla. Skupljanje u rano proljeće i kasnu jesen treba izbjegavati budući da pčele u tom razdoblju imaju promijenjenu fiziologiju. Ako se ispitivanja moraju provoditi u rano proljeće ili kasnu jesen, pčele se mogu pustiti da se izlegu u inkubatoru i jedan tjedan uzgajati na „pčelinjoj hrani" (pelud prikupljena iz saća) i šećernoj otopini. Pčele liječene kemikalijama kao što su antibiotici, sredstva protiv varooze itd. ne smiju se koristiti u toksikološkim ispitivanjima četiri tjedna nakon prestanka zadnjeg liječenja.

1.5.2. **Uvjeti smještaja i hranjenja**

Koriste se dobro zračeni kavezi koji se lako čiste. Mogu se koristiti svi prikladni materijali npr. nehrđajući čelik, žičana mreža, plastični ili jednokratni drveni kavezi itd. Poželjno je koristiti skupine od 10 pčela po kavezu. Veličina ispitnih kaveza treba biti prilagođena broju pčela tj. treba im osiguravati dovoljno prostora.

Pčele se u pokusnoj prostoriji drže u mraku na temperaturi od 25 ± 2 °C. Za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja treba bilježiti relativnu vlažnost, u pravilu oko 50 – 70 %. Svi postupci, uključujući obradu i promatranja, mogu se provoditi na (dnevnom) svjetlu. Kao hrana se koristi šećerna otopina u vodi s konačnom koncentracijom 500 g/l (50 % w/v). Nakon primjene ispitnih doza hranu treba davati *ad libitum*. Sustav hranjenja treba omogućivati bilježenje unosa hrane za svaki kavez (vidjeti odjeljak 1.6.3.1.). Može se koristiti staklena cjevčica (oko 50 mm dužine i 10 mm širine čiji je otvoreni kraj sužen na oko 2 mm promjera).

1.5.3. **Priprema pčela**

Skupljene se pčele nasumično rasporede u ispitne kaveze, koji su nasumično smješteni u pokusnoj prostoriji.

▼B

Pčele se mogu izgladnjivati najviše 2 sata prije početka ispitivanja. Preporučuje se da se pčelama uskrati hrana prije obrade kako bi sve pčele imale jednak crijevni sadržaj na početku ispitivanja. Prije početka ispitivanja moribundne pčele treba odbaciti i zamijeniti zdravim pčelama.

1.5.4. **Priprema doza**

Ako je ispitivana tvar mješljiva s vodom, ona se može izravno dispergirati u 50 %-tnoj šećernoj otopini. U slučaju tehničkih proizvoda i tvari koje su slabo topljive u vodi mogu se koristiti nosači, kao što je organsko otapalo, emulgatori ili dispergenti niske toksičnosti za pčele (npr. aceton, dimetilformamid, dimetilsulfoksid). Koncentracija nosača ovisi o topljivosti ispitivane tvari i treba biti jednaka u svim ispitnim koncentracijama. Ipak, koncentracija nosača od 1 % je općenito primjerena i ne bi se smjela prekoračiti.

Treba pripremiti odgovarajuće kontrolne otopine, tj. ako se za otapanje ispitivane tvari koristi otapalo ili dispergent, treba koristiti dvije odvojene kontrolne skupine: otopina u vodi i šećerna otopina s otapalom/nosačem u koncentraciji koja se koristi u otopinama za doziranje.

1.6. POSTUPAK

1.6.1. **Ispitne i kontrolne skupine**

Broj doza i ponavljanja treba zadovoljavati statističke zahtjeve za određivanje LD_{50} s granicama pouzdanosti 95 %. U pravilu je za test potrebno pet doza u geometrijskom nizu s faktorom do najviše 2,2, koje obuvaćaju područje LD_{50}. Ipak, faktor razrjeđenja i broj koncentracija za doziranje treba odrediti s obzirom na nagib krivulje toksičnosti (doza – smrtnost) i vodeći računa o statističkoj metodi odabranoj za analizu rezultata. Ispitivanje za određivanje raspona omogućuje odabir odgovarajućih koncentracija za doziranje.

Svakoj ispitnoj koncentraciji treba izložiti najmanje tri paralelne ispitne skupine od po 10 pčela. Uz ispitni niz potrebne su još najmanje tri kontrolne serije, svaka po 10 pčela. Za primijenjena otapala/nosače treba predvidjeti dodatne kontrolne serije (vidjeti odjeljak 1.5.4).

1.6.2. **Toksični standard**

U ispitne nizove treba uključiti toksični standard. Treba odabrati barem tri doze koje obuhvaćaju očekivanu vrijednost LD_{50}. Potrebna su najmanje tri paralelna kaveza s po 10 pčela po ispitnoj dozi. Poželjno je da se kao toksični standard koristi dimetoat, čiji se utvrđeni oralni LD_{50} za 24 sata kreće u području 0,10 – 0,35 μg a.s. po pčeli (2). Ipak, prihvatljivi su i drugi toksični standardi ako se može osigurati dovoljno podataka za provjeru očekivanog odgovora na dozu (npr. paration).

▼B

1.6.3. **Izlaganje**

1.6.3.1. *Primjena doza*

Svakoj ispitnoj skupini pčela treba dati 100 – 200 µl 50 %-tne šećerne otopine u vodi koja sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivane tvari. Kod proizvoda niske topljivosti, niske toksičnosti ili niske koncentracije u formulaciji potrebna je veća količina jer se moraju koristiti veći udjeli u šećernoj otopini. Treba pratiti količinu unosa obrađene hrane po skupinama. Kad se hrana potroši (obično unutar 3 – 4 sata) hranilica se uklanja iz kaveza i zamjenjuje hranilicom koja sadrži samo šećernu otopinu. Šećerne otopine se zatim daju *ad libitum*. Kod nekih se spojeva kod većih koncentracija može dogoditi da zbog odbijanja ispitne doze dođe do slabog unosa hrane ili potpunog izostanka unosa. Nakon najviše 6 sati nepotrošenu obrađenu hranu treba zamijeniti čistom šećernom otopinom. Treba procijeniti unesenu količinu obrađene hrane (npr. mjerenje volumena/mase preostale obrađene hrane).

1.6.3.2. *Trajanje*

Ispitivanje po mogućnosti treba trajati 48 sati nakon što se ispitna otopina zamijeni čistom šećernom otopinom. Ako smrtnost nastavi rasti više od 10 % nakon prva 24 sata, vrijeme ispitivanje treba produžiti do najviše 96 sati, pod uvjetom da kontrolna smrtnost nije viša od 10 %.

1.6.4. **Promatranja**

Smrtnost se bilježi 4 sata nakon početka ispitivanja i zatim nakon 24 i 48 sati (tj. nakon davanja doze). Ako je potrebno duže razdoblje promatranja, ocjenjivanje se nastavlja u razmacima od 24 sati do najviše 96 sati, pod uvjetom da kontrolna smrtnost ne prelazi 10 %.

Treba procijeniti količinu unosa hrane po skupinama. Usporedbom količine unosa obrađene i neobrađene hrane unutar predviđenih 6 sati mogu se dobiti informacije o ukusnosti obrađene hrane.

Tijekom razdoblja ispitivanja treba bilježiti sva uočena neuobičajena ponašanja.

1.6.5. **Granično ispitivanje**

U pojedinim se slučajevima (npr. kad se očekuje da ispitivana tvar ima nisku toksičnost) može provesti granično ispitivanje uz primjenu 100 µg a.s. po pčeli kako bi se dokazalo da je LD_{50} viši od te vrijednosti. Treba primijeniti isti postupak, uključujući tri paralelne ispitne skupine po ispitnoj dozi, relevantne kontrole, procjenu količine unosa obrađene hrane i korištenje toksičnog standarda. Ako se pojavi smrtnost, treba provesti potpuno istraživanje. Treba zabilježiti sve uočene subletalne učinke (vidjeti odjeljak 1.6.4.).

▼B

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku, navodeći za svaku ispitnu i kontrolnu skupinu kao i skupinu toksičnog standarda broj pčela i smrtnost u svakom vremenu promatranja te broj pčela promijenjenog ponašanja. Podaci o smrtnosti analiziraju se prikladnim statističkim metodama (npr. analiza vjerojatnosti, pomični prosjek, binomna vjerojatnost) (3)(4). Izrade se krivulje doza-odgovor u svakom preporučenom vremenu promatranja i izračunaju nagibi krivulja te medijan letalnih doza (LD_{50}) s granicama pouzdanosti 95 %. Ispravci s obzirom na kontrolnu smrtnost mogu se učiniti pomoću Abbottove korekcije (4)(5). Ako obrađena hrana nije u cijelosti potrošena, treba odrediti unesenu dozu ispitivane tvari po skupinama. LD_{50} treba izraziti u µg ispitivane tvari po pčeli.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

2.2.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva (npr. stabilnost u vodi, tlak pare),

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući strukturnu formulu, čistoću (tj. za pesticide: identitet i koncentraciju aktivne(-ih) tvari).

2.2.2. **Ispitna vrsta:**

— znanstveni naziv, pasmina, približna dob (u tjednima), način skupljanja, datum skupljanja,

— informacije o zajednicama iz kojih potječu ispitne pčele, uključujući zdravstveno stanje, eventualne bolesti odraslih i prethodne obrade itd.

2.2.3. **Ispitni uvjeti**

— temperatura i relativna vlažnost pokusne prostorije,

— uvjeti smještaja, uključujući vrstu, veličinu i materijal kaveza,

— način pripreme radnih i ispitnih otopina (ako se koristi otapalo, otapalo i koncentracija),

— plan ispitivanja, npr. broj i ispitne koncentracije, broj kontrola; za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu: broj paralelnih kaveza i broj pčela po kavezu,

— datum ispitivanja.

▼B

2.3.4. **Rezultati:**

— rezultati preliminarnog istraživanja za određivanje raspona, ako se provodi,

— sirovi podaci: smrtnost pri svakoj ispitanoj dozi u svakom vremenu promatranja,

— graf krivulja doza-odgovor na kraju ispitivanja,

— vrijednosti LD_{50} s granicama pouzdanosti 95 % u svakom preporučenom vremenu promatranja, za ispitivanu tvar i toksični standard,

— statistički postupci primijenjeni za određivanje LD_{50},

— smrtnost u kontrolama,

— drugi zapaženi ili izmjereni biološki učinci npr. neuobičajeno ponašanje pčela (uključujući odbijanje ispitne doze), količina unosa hrane u obrađenim i neobrađenim skupinama,

— sva odstupanja od ovdje opisanih ispitnih postupaka i sve druge relevantne informacije.

3. **REFERENCE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, str. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, str. 99-113.

(4) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(5) Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, str. 265-267.

▼B

C.17. MEDONOSNE PČELE – ISPITIVANJE AKUTNE KONTAKTNE TOKSIČNOSTI

1. METODA

Ova metoda ispitivanja akutne toksičnosti odgovara smjernici OECD TG 214 (1998.).

1.1. UVOD

Ovaj toksikološki test je laboratorijska metoda namijenjena ocjenjivanju akutne kontaktne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih kemikalija za odrasle medonosne pčele radilice.

Prilikom ocjenjivanja toksičnih svojstava tvari ponekad je potrebno odrediti akutnu kontaktnu toksičnost kod medonosnih pčela, npr. kad je vjerojatno izlaganje pčela kemikaliji. Test akutne kontaktne toksičnosti provodi se kako bi se odredila svojstvena toksičnost pesticida i drugih kemikalija za pčele. Na temelju rezultata ovog testa treba definirati potrebu za daljnjim ocjenjivanjem. Ova se metoda može koristiti posebno u stupnjevitim programima za ocjenjivanje opasnosti pesticida za pčele, koji se temelje na postupnom prijelazu s laboratorijskih toksikoloških ispitivanja na poluterenske i terenske pokuse (1). Pesticidi se mogu ispitivati kao aktivne tvari (a.s.) ili kao formulirani proizvodi.

Za provjeru osjetljivosti pčela i preciznosti ispitnog postupka treba koristiti toksični standard.

1.2. DEFINICIJE

Akutna kontaktna toksičnost: štetni učinci koji nastupaju unutar najviše 96 sati nakon topikalne primjene jedne doze tvari.

Doza: primijenjena količina ispitivane tvari. Doza se izražava kao masa (μg) ispitivane tvari po ispitnoj životinji (μg/pčela).

Kontaktni LD_{50} (medijan letalne doze): statistički izvedena pojedinačna doza tvari koja može izazvati smrt 50 % životinja kod kontaktne primjene. Vrijednost LD_{50} izražava se u μg ispitivane tvari po pčeli. Kod pesticida ispitivana tvar može biti aktivna tvar (a.s.) ili formulirani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih tvari.

Smrtnost: životinja se bilježi kao mrtva kad je potpuno nepomična.

1.3. NAČELO ISPITNE METODE

Odrasle medonosne pčele radilice (*Apis mellifera*) izlažu se nizu doza ispitivane tvari otopljene u odgovarajućem nosaču izravnim nanošenjem na prsni koš (kapljice). Ispitivanje traje 48 sati. Ako se stopa smrtnosti povećava između 24. i 48. sata, a kontrolna smrtnost ostane na prihvaćenoj razini tj. ≤ 10 %, vrijeme ispitivanja treba produžiti na najviše 96 sati. Smrtnost se bilježi dnevno i uspoređuje s kontrolnim vrijednostima. Rezultati se analiziraju kako bi se izračunao LD_{50} nakon 24 i 48 sati te, u slučaju produžetka istraživanja, nakon 72 i 96 sati.

▼B

1.4. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

— prosječna smrtnost u ukupnom broju kontrola na kraju ispitivanja ne smije biti viša od 10 %,

— LD_{50} toksičnog standarda odgovara utvrđenom području.

1.5. OPIS ISPITNE METODE

1.5.1. **Skupljanje pčela**

Treba koristiti mlade odrasle pčele radilice tj. pčele iste dobi, stanja uhranjenosti, pasmine itd. Pčele trebaju potjecati iz dobro hranjenih, zdravih zajednica s maticom, u kojima nema pojava bolesti (u mjeri u kojoj je to moguće) i čija je povijest i fiziološki status poznat. Treba ih skupiti u jutro uporabe ili večer prije ispitivanja i držati u ispitnim uvjetima do sljedećeg dana. Prikladne su pčele skupljene s okvira bez legla. Skupljanje u rano proljeće i kasnu jesen treba izbjegavati budući da pčele u tom razdoblju imaju promijenjenu fiziologiju. Ako se ispitivanja moraju provoditi u rano proljeće ili kasnu jesen, pčele se mogu pustiti da se izlegu i jedan tjedan uzgajati na „pčelinjoj hrani" (pelud prikupljena iz saća) i šećernoj otopini. Pčele liječene kemikalijama kao što su antibiotici, sredstva protiv varooze itd. ne smiju se koristiti u toksikološkim ispitivanjima četiri tjedna nakon prestanka zadnjeg liječenja.

1.5.2. **Uvjeti smještaja i hranjenja**

Koriste se dobro zračeni kavezi koji se lako čiste. Mogu se koristiti svi prikladni materijali npr. nehrđajući čelik, žičana mreža, plastični, jednokratni drveni kavezi itd. Veličina ispitnih kaveza treba biti prilagođena broju pčela tj. treba im osiguravati dovoljno prostora. Poželjno je koristiti skupine od 10 pčela po kavezu.

Pčele se u pokusnoj prostoriji drže u mraku na temperaturi od 25 ± 2 °C. Za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja treba bilježiti relativnu vlažnost, u pravilu oko 50 – 70 %. Svi postupci, uključujući obradu i promatranje, mogu se provoditi na (dnevnom) svjetlu. Kao hrana se koristi šećerna otopina u vodi s konačnom koncentracijom 500 g/l (50 % w/v), koju treba davati *ad libitum* tijekom razdoblja ispitivanja putem hranilice za pčele. To može biti staklena cjevčica (približno 50 mm dužine i 10 mm širine čiji je otvoreni kraj sužen na oko 2 mm promjera).

1.5.3. **Priprema pčela**

Skupljene pčele se prije primjene ispitivane tvari mogu anestetizirati ugljikovim dioksidom ili dušikom. Količinu anestetika i vrijeme izlaganja treba svesti na najmanju moguću mjeru. Prije početka ispitivanja moribundne pčele treba odbaciti i zamijeniti zdravim pčelama.

1.5.4. **Priprema doza**

Ispitivana se tvar primjenjuje kao otopina u nosaču tj. organskom otapalu ili vodenoj otopini sa sredstvom za vlaženje. Poželjno je da se kao organsko otapalo koristi aceton, ali mogu se koristiti i druga organska otapala niske toksičnosti za pčele (npr. dimetilformamid, dimetilsulfoksid). U slučaju formuliranih proizvoda dispergiranih u vodi i jako polarnih organskih tvari koje nisu topljive u organskim otapalima, primjena otopina može se olakšati pripremom u slaboj otopini komercijalnog sredstva za vlaženje (npr. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Treba pripremiti odgovarajuće kontrolne otopine tj. ako se za otapanje ispitivane tvari koristi otapalo ili dispergent, treba koristiti dvije odvojene kontrolne skupine, jednu obrađenu vodom i jednu obrađenu otapalom/dispergentom.

1.6. POSTUPAK

1.6.1. **Ispitne i kontrolne skupine**

Broj doza i ponavljanja treba zadovoljavati statističke zahtjeve za određivanje LD_{50} s granicama pouzdanosti 95 %. U pravilu je za test potrebno pet doza u geometrijskom nizu s faktorom do najviše 2,2, koje obuvaćaju područje LD_{50}. Ipak, broj doza treba odrediti s obzirom na nagib krivulje toksičnosti (doza – smrtnost) i vodeći računa o statističkoj metodi odabranoj za analizu rezultata. Ispitivanje za određivanje raspona omogućuje odabir odgovarajućih doza.

Svakom ispitnom koncentracijom treba dozirati najmanje tri paralelne ispitne skupine od po 10 pčela.

Uz ispitni niz potrebne su još najmanje tri kontrolne serije, svaka po 10 pčela. Ako se koristi organsko otapalo ili sredstvo za vlaženje, treba uvesti tri dodatne kontrolne serije s po 10 pčela za otapalo odnosno sredstvo za vlaženje.

1.6.2. **Toksični standard**

U ispitne nizove treba uključiti toksični standard. Treba odabrati barem tri doze koje obuhvaćaju očekivanu vrijednost LD_{50}. Potrebna su najmanje tri paralelna kaveza s po 10 pčela po ispitnoj dozi. Poželjno je da se kao toksični standard koristi dimetoat, čiji se utvrđeni oralni LD_{50} za 24 sata kreće u području 0,10 – 0,30 μg a.s. po pčeli (2). Ipak, prihvatljivi su i drugi toksični standardi ako se može osigurati dovoljno podataka za provjeru očekivanog odgovora na dozu (npr. paration).

1.6.3. **Izlaganje**

1.6.3.1. *Primjena doza*

Anestetizirane se pčele obrađuju pojedinačno topikalnom primjenom. Pčele se nasumično raspoređuju po ispitnim dozama i kontrolama. 1 μl otopine koja sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivane tvari treba primijeniti na stražnju stranu prsnog koša svake pčele pomoću mikroaplikatora. U opravdanom se slučaju mogu koristiti i drugi volumeni. Nakon toga se pčele rasporede po ispitnim kavezima i daje im se šećerna otopina.

1.6.3.2. *Trajanje*

Ispitivanje po mogućnosti traje 48 sati. Ako se između 24. i 48. sata smrtnost poveća za više od 10 %, vrijeme ispitivanja treba produžiti do najviše 96 sati, pod uvjetom da kontrolna smrtnost nije viša od 10 %.

▼B

1.6.4. **Promatranja**

Smrtnost se bilježi 4 sata nakon doziranja i zatim nakon 24 i 48 sati. Ako je potrebno duže razdoblje promatranja, ocjenjivanje se nastavlja u razmacima od 24 sati do najviše 96 sati, pod uvjetom da kontrolna smrtnost ne prelazi 10 %.

Tijekom razdoblja ispitivanja treba bilježiti sva uočena neuobičajena ponašanja.

1.6.5. **Granično ispitivanje**

U pojedinim se slučajevima (npr. kad se očekuje da ispitivana tvar ima nisku toksičnost) može provesti granično ispitivanje uz primjenu 100 μg a.s. po pčeli kako bi se dokazalo da je LD_{50} viši od te vrijednosti. Treba primijeniti isti postupak, uključujući tri paralelne ispitne skupine po ispitnoj dozi, relevantne kontrole i korištenje toksičnog standarda. Ako se pojavi smrtnost, treba provesti potpuno istraživanje. Treba zabilježiti sve uočene subletalne učinke (vidjeti odjeljak 1.6.4.).

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. PODACI

Podatke treba sažeto prikazati u tabličnom obliku, navodeći za svaku ispitnu i kontrolnu skupinu kao i skupinu toksičnog standarda broj pčela i smrtnost u svakom vremenu promatranja te broj pčela promijenjenog ponašanja. Podaci o smrtnosti analiziraju se prikladnim statističkim metodama (npr. analiza vjerojatnosti, pomični prosjek, binomna vjerojatnost) (3)(4). Izrade se krivulje doza-odgovor u svakom preporučenom vremenu promatranja (tj. 24 sata, 48 sati i, prema potrebi, 72 i 96 sati) i izračunaju nagibi krivulja te medijan letalnih doza (LD_{50}) s granicama pouzdanosti 95 %. Ispravci s obzirom na kontrolnu smrtnost mogu se učiniti pomoću Abbottove korekcije (4)(5). LD_{50} treba izraziti u μg ispitivane tvari po pčeli.

2.2. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

2.2.1. **Ispitivana tvar:**

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva (npr. stabilnost u vodi, tlak pare),

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući strukturnu formulu, čistoću (tj. za pesticide: identitet i koncentraciju aktivne(-ih) tvari).

2.2.2. **Ispitna vrsta:**

— znanstveni naziv, pasmina, približna dob (u tjednima), način skupljanja, datum skupljanja,

— informacije o zajednicama iz kojih potječu ispitne pčele, uključujući zdravstveno stanje, eventualne bolesti odraslih i prethodne obrade itd.

▼B

2.2.3. **Ispitni uvjeti**

— temperatura i relativna vlažnost pokusne prostorije,

— uvjeti smještaja, uključujući vrstu, veličinu i materijal kaveza,

— način primjene ispitivane tvari npr. otapalo nosač, volumen ispitne otopine, primijenjeni anestetici,

— plan ispitivanja, npr. broj i ispitne doze, broj kontrola; za svaku ispitnu dozu i kontrolu: broj paralelnih kaveza i broj pčela po kavezu,

— datum ispitivanja.

2.2.4. **Rezultati:**

— rezultati preliminarnog istraživanja za određivanje raspona, ako se provodi,

— sirovi podaci: smrtnost pri svakoj ispitanoj koncentraciji u svakom vremenu promatranja,

— graf krivulja doza-odgovor na kraju ispitivanja,

— vrijednosti LD_{50} s granicama pouzdanosti 95 % u svakom preporučenom vremenu promatranja, za ispitivanu tvar i toksični standard;

— statistički postupci primijenjeni za određivanje LD_{50},

— smrtnost u kontrolama,

— drugi zapaženi ili izmjereni biološki učinci i svi neuobičajeni odgovori pčela,

— sva odstupanja od ovdje opisanih ispitnih postupaka i sve druge relevantne informacije.

3. **REFERENCE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, str. 151-165. March, 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, str. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, str. 99-113.

(4) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(5) Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, str. 265-267.

▼B

C.18. ŠARŽNO ISPITIVANJE ADSORPCIJE/DESORPCIJE U RAVNOTEŽI

1. METODA

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG 106 za određivanje adsorpcije/desorpcije u tlu metodom šaržnog ispitivanja u ravnoteži.

1.1. UVOD

Ova metoda uzima u obzir prstenasti test i radionicu o odabiru tala za izradu adsorpcijskog testa (1)(2)(3)(4) kao i postojeće smjernice na nacionalnoj razini (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Istraživanja adsorpcije/desorpcije korisna su za dobivanje potrebnih informacija o pokretljivosti kemikalija i njihovoj razdiobi u zemnim, vodnim i zračnim segmentima biosfere (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Te se informacije mogu koristiti za predviđanje odnosno procjenu npr. raspoloživosti kemikalije za razgradnju (22)(23), pretvorbe i unosa u organizme (24), ispiranja kroz profil tla (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), hlapljivosti iz tla (21)(29)(30), otjecanja s kompnenih površina u prirodne vode (18)(31)(32). Podaci o adsorpciji mogu se koristiti u poredbene svrhe i za modeliranje (19)(33)(34)(35).

Razdioba kemikalije između faze tla i vodene faze je složen proces koji ovisi o nizu različitih faktora: kemijska svojstva tvari (12)(36)(37)(38)(39)(40), svojstva tla (4)(12)(13)(14)(41)(42) (43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) i klimatski faktori kao što su padaline, temperatura, sunčeva svjetlost i vjetar. Stoga se brojne pojave i mehanizmi koji sudjeluju u procesu adsorpcije kemikalije na tlo ne mogu u potpunosti definirati pojednostavnjenim laboratorijskim modelom kao što je ova metoda. Ipak, čak i ako ovaj pokušaj ne može obuhvatiti sve moguće slučajeve u okolišu, on daje vrijedne informacije o okolišnoj relevantnosti adsorpcije kemikalije.

Vidjeti također Opći uvod.

1.2. PODRUČJE PRIMJENE

Svrha ove metode je procijeniti adsorpcijsko/desorpcijsko ponašanje tvari na tlima. Cilj je dobiti sorpcijsku vrijednost koja se može koristiti za predviđanje razdiobe u različitim uvjetima okoliša; u tu se svrhu ravnotežni koeficijenti adsorpcije za kemikaliju na različitim tlima određuju kao funkcija svojstava tla (npr. sadržaj organskog ugljika, sadržaj gline, tekstura tla i pH). Treba koristiti različite vrste tla kako bi se što šire obuhvatile interakcije pojedine tvari s tlima koja se pojavljuju u prirodi.

U ovoj metodi adsorpcija predstavlja proces vezanja kemikalije na površinu tla; ona ne razlikuje različite adsorpcijske procese (fizikalna i kemijska adsorpcija) i procese kao što su površinski katalizirana razgradnja, slojna adsorpcija ili kemijska reakcija. Osim toga, ona ne uzima u obzir adsorpciju koja se javlja na koloidnim česticama (promjera $< 0{,}2$ μm) koje stvara tlo.

▼B

Smatra se da su najvažniji parametri tla za adsorpciju sadržaj organskog ugljika (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), sadržaj gline i tekstura tla (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) te pH za ionizirajuće spojeve (3)(4)(42). Ostali parametri tla koji mogu imati utjecaja na adsorpciju/desorpciju određene tvari su efektivni kapacitet izmjene kationa (ECEC), sadržaj amorfnog željeza i aluminijevih oksida, posebno kod vulkanskih i tropskih tala (4) kao i specifična površina (49).

Test je namijenjen ocjenjivanju adsorpcije kemikalije na različitim vrstama tla s različitim sadržajem organskog ugljika i gline i različitom teksturom tla i pH. On obuhvaća tri razine:

1. razina: preliminarno istraživanje za određivanje:

— omjera tlo/otopina,

— ravnotežnog vremena za adsorpciju i količine ispitivane tvari koja je adsorbirana u ravnoteži,

— adsorpcije ispitivane tvari na površinama ispitnih posuda i stabilnosti ispitivane tvari u razdoblju ispitivanja.

2. razina: test pretraživanja: proučavanje adsorpcije na pet različitih vrsta tla pri jednoj koncentraciji uz pomoć kinetike adsorpcije i određivanja koeficijenta razdiobe K_d i $K_{oc.}$

3. razina: određivanje Freundlichovih adsorpcijskih izotermi u svrhu određivanja utjecaja koncentracije na obim adsorpcije na tlo.

Proučavanje desorpcije uz pomoć kinetike desorpcije/ Freundlichovih desorpcijskih izotermi (Dodatak 1.).

1.3. DEFINICIJE I JEDINICE

Symbol	Definicija	Jedinice
A_{t_i}	postotak adsorpcije u vremenu t_i	%
A_{eq}	postotak adsorpcije u adsorpcijskoj ravnoteži	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo u vremenu t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo u vremenskom intervalu Δt_i	µg
$m_s^{ads}(ec)$	masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži	µg
m_0	masa ispitivane tvari u epruveti na početku adsorpcijskog testa	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masa ispitivane tvari izmjerena u alikvotu v_a^A u vremenu t_i	µg
$m_{ap}^{ads}(ec)$	masa tvari u otopini u adsorpcijskoj ravnoteži	µg
m_{soil}	količina faze tla, izražena u suhoj masi tla	g

▼B

Symbol	Definicija	Jedinice
C_{st}	masena koncentracija radne otopine tvari	μg cm^{-3}
C_0	početna masena koncentracija ispitne otopine u dodiru s tlom	μg cm^{-3}
$C_{ap}^{ads}(t_i)$	masena koncentracija tvari u vodenoj fazi u vremenu t_i u kojemu se provodi analiza	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(ec)$	sadržaj tvari adsorbiran na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži	μg g^{-1}
$C_{ap}^{ads}(ec)$	masena koncentracija tvari u vodenoj fazi u adsorpcijskoj ravnoteži	μg cm^{-3}
V_0	početni volumen vodene faze u dodiru s tlom tijekom adsorpcijskog testa	cm^3
v_a^A	volumen alikvota u kojemu se mjeri ispitivana tvar	cm^3
K_d	koeficijent razdiobe za adsorpciju	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	koeficijent adsorpcije normiran na organski ugljik	cm^3 g^{-1}
K_{so}	koeficijent razdiobe normiran na organsku tvar	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlichov koeficijent adsorpcije	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichov eksponent	
D_{t_i}	postotak desorpcije u vremenu t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	postotak desorpcije u vremenskom intervalu Δt_i	%
K_{des}	prividni koeficijent desorpcije	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichov koeficijent desorpcije	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{ap}^{des}(t_i)$	masa ispitivane tvari desorbirana iz tla u vremenu t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masa ispitivane tvari desorbirana iz tla u intervalu Δt_i	μg
$m_m^{des}(ec)$	masa tvari određena analitički u vodenoj fazi u desorpcijskoj ravnoteži	μg
$m_{ap}^{des}(ec)$	ukupna masa ispitivane tvari desorbirana u desorpcijskoj ravnoteži	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masa tvari koja ostaje adsorbirana na tlu nakon vremenskog intervala Δt_i	μg
m_{ap}^A	masa tvari preostala nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže zbog nepotpune zamjene volumena	μg
$C_s^{des}(ec)$	sadržaj ispitivane tvari koji ostaje adsorbiran na tlu u desorpcijskoj ravnoteži	μg g^{-1}

▼B

Symbol	Definicija	Jedinice
$C_{ap}^{des}(ec)$	masena koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi u desorpcijskoj ravnoteži	μg cm^{-3}
V_T	ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom tijekom pokusa s kinetikom desorpcije koji se izvodi serijskom metodom	cm^3
V_R	volumen supernatanta uklonjen iz epruvete nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže i zamijenjen istim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volumen alikvota uzetog na analizu od vremena (i) tijekom pokusa s kinetikom desorpcije koji se izvodi serijskom metodom	cm^3
$V_{ra}i^D$	volumen otopine uzet iz epruvete (i) u svrhu mjerenja ispitivane tvari u pokusu s kinetikom desorpcije (paralelna metoda)	cm^3
V_r^F	volumen otopine uzet iz epruvete u svrhu mjerenja ispitivane tvari u desorpcijskoj ravnoteži	cm^3
MB	bilanca mase	%
m_E	ukupna masa ispitivane tvari ekstrahirana iz tla i sa stijenki ispitne posude u dva koraka	μg
V_{rec}	volumen supernatanta dobiven nakon adsorpcijske ravnoteže	cm^3
P_{ow}	podjelni koeficijent oktanol/voda	
pKa	konstanta disocijacije	
S_w	topljivost u vodi	g l^{-1}

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Poznati volumeni otopina ispitivane tvari (koja može biti neobilježena ili radioaktivno obilježena) u 0,01 M $CaCl_2$ u poznatoj koncentraciji dodaju se uzorcima tla poznate suhe mase koji su prethodno ekvilibrirani u 0,01 M $CaCl_2$. Smjesa se trese koliko je potrebno. Suspenzije tla se zatim odvoje centrifugiranjem i, po želji, filtracijom te se analizira vodena faza. Količina ispitivane tvari adsorbirana na uzorku tla izračunava se kao razlika između količine ispitivane tvari koja je prvobitno bila prisutna u otopini i količine preostale na kraju pokusa (neizravna metoda).

Osim toga, adsorbirana količina ispitivane tvari može se odrediti i izravno analizom tla (izravna metoda). Ovaj postupak, koji uključuje postupnu ekstrakciju iz tla odgovarajućim otapalom, preporučuje se u slučajevima kad se razlika koncentracije tvari u otopini ne može točno odrediti. Primjeri takvih slučajeva su: adsorpcija ispitivane tvari na površini ispitnih posuda, nestabilnost ispitivane tvari u vremenskom okviru pokusa, slaba adsorpcija koja rezultira tek neznatnom promjenom koncentracije otopine i jaka adsorpcija kojom se dobiva niska koncentracija koja se ne može točno odrediti. Ako se koristi radioaktivno obilježena tvar, ekstrakcija iz tla može se izbjeći analizom faze tla izgaranjem i brojenjem metodom tekućinske scintilacije. Međutim, brojenje metodom tekućinske scintilacije je nespecifična tehnika koja ne razlikuje polazne proizvode od proizvoda pretvorbe; stoga ga treba koristiti samo ako je ispitivana kemikalija stabilna u razdoblju ispitivanja.

▼B

1.5. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Kemijski reagensi trebaju biti analitički čisti. Preporučuje se uporaba neobilježenih ispitivanih tvari poznatog sastava i po mogućnosti barem 95 %-tne čistoće ili radioaktivno obilježenih ispitivanih tvari poznatog sastava i radioaktivne čistoće. U slučaju obilježivača s kratkim vremenom poluraspada, treba primijeniti korekcije za raspadanje.

Prije provedbe ispitivanja adsorpcije/desorpcije trebaju biti raspoložive sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) topljivost u vodi (A.6.);

(b) tlak pare (A.4.) i/ili konstanta Henryjevog zakona;

(c) abiotička razgradnja: hidroliza kao funkcija pH (C.7.);

(d) podjelni koeficijent (A.8.);

(e) laka biorazgradivost (C.4.) ili aerobna i anaerobna pretvorba u tlu;

(f) pKa ionizirajućih tvari;

(g) izravna fotoliza u vodi (tj. apsorpcijski spektar UV-VIS u vodi, kvantni prinos) i fotokemijska razgradnja na tlu.

1.6. PRIMJENLJIVOST TESTA

Test se može primijeniti kod kemikalija za koje je raspoloživa dovoljno točna analitička metoda. Važan parametar koji može utjecati na pouzdanost rezultata, posebno ako se primjenjuje neizravna metoda, je stabilnost ispitivane tvari u vremenskom okviru ispitivanja. Prema tomu, treba obavezno provjeriti stabilnost tvari u preliminarnom istraživanju; ako je unutar vremenskog okvira ispitivanja uočena pretvorba, preporučuje se da se u glavnom istraživanju analizira i faza tla i tekuća faza.

Poteškoće u provedbi ovog ispitivanja mogu se javiti kod ispitivanih tvari koje su slabo topljive u vodi ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) kao i kod tvari visokog naboja jer se koncentracija u vodenoj fazi ne može analitički izmjeriti s dovoljnom točnošću. U tom slučaju treba poduzeti dodatne korake. Smjernice za prevladavanje tih problema mogu se naći u odgovarajućim odjeljcima ove metode.

Kod ispitivanja hlapljivih tvari treba voditi računa da se izbjegnu gubici tijekom istraživanja.

1.7. OPIS METODE

1.7.1. **Aparatura i kemijski reagensi**

Standardna laboratorijska oprema, posebno:

(a) epruvete odnosno posude za izvođenje pokusa. Važno je da se te epruvete odnosno posude

— mogu izravno umetnuti u uređaj za centrifugiranje kako bi se greške kod rukovanja i prijenosa svele na najmanju moguću mjeru,

— budu izrađene od inertnog materijala, kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri smanjila adsorpcija ispitivane tvari na njihovoj površini;

▼B

(b) naprava za tresenje: rotacijska tresilica ili istovjetna oprema; naprava za tresenje treba za vrijeme tresenja održavati tlo u suspenziji;

(c) centrifuga: po mogućnosti velike brzine, npr. centrifugalne sile > 3 000 g, s regulacijom temperature, koja iz vodene otopine može ukloniti čestice promjera većeg od 0,2 μm. Za vrijeme miješanja i centrifugiranja posude trebaju biti poklopljene kako bi se izbjeglo hlapljenje i gubici vode; da bi se smanjila adsorpcija, treba koristiti inaktivirane poklopce kao što su poklopci s navojem obloženi teflonom;

(d) fakultativno: naprava za filtriranje; filtri poroznosti 0,2 μm, sterilni, jednokratni. Kod filtara posebnu pažnju treba posvetiti izboru materijala kako bi se izbjegli gubici ispitivane tvari na filtru; kod slabo topljivih ispitivanih tvari ne preporučuju se filtri od organskog materijala;

(e) analitički instrumenti prikladni za mjerenje koncentracije ispitivane kemikalije;

(f) laboratorijski sušionik koja može održavati temperaturu od 103 °C do 110 °C.

1.7.2. **Opisivanje i odabir tala**

Tla treba opisati pomoću tri parametra koji se smatraju najvećim dijelom odgovornima za adsorpcijsku sposobnost: organski ugljik, sadržaj gline i tekstura tla te pH. Kao što je već spomenuto (vidjeti Područje primjene), i druga fizikalno-kemijska svojstva tla mogu imati utjecaja na adsorpciju/desorpciju određene tvari pa ih treba uzeti u obzir prema potrebi.

Vrlo je važno koje će se metode koristiti za opisivanje tla jer one mogu imati značajan utjecaj na rezultate. Stoga se preporučuje da se pH tla mjeri u otopini 0,01 M $CaCl_2$ (to je otopina koja se koristi kod ispitivanja adsorpcije/desorpcije) u skladu s odgovarajućom metodom ISO (ISO-10390-1). Preporučuje se da se odrede i druga relevantna svojstva tla u skladu sa standardnim metodama (primjerice ISO „Handbook of Soil Analysis”); to omogućuje da se analiza podataka o sorpciji temelji na jedinstvenim međunarodnim parametrima tla. Neke smjernice za postojeće standardne analitičke metode i opisivanja tla navedene su u literaturi (50-52). Za baždarenje metoda za ispitivanje tla preporučuje se korištenje referentnih tala.

Smjernice za odabir tala za adsorpcijske/desorpcijske pokuse nalaze se u tablici 1. Sedam odabranih tala obuhvaćaju vrste tla koje se susreću u umjerenim geografskim zonama. U slučaju ionizirajućih ispitivanih tvari, odabrana tla trebaju obuhvaćati širok raspon pH vrijednosti kako bi se mogla ocijeniti adsorpcija tvari u njezinom ioniziranom i neioniziranom obliku. Smjernice za broj tala koji treba koristiti u različitim fazama ispitivanja nalaze se u odjeljku 1.9. „Provođenje ispitivanja”.

Ako se ipak koriste druge vrste tla, ona se moraju opisati na temelju istih parametara i trebaju imati sličan raspon svojstava kao tla opisana u tablici 1., čak i onda ako u potpunosti ne ispunjavaju kriterije.

▼B

Tablica 1.:

Smjernice za odabir uzoraka tla za ispitivanje adsorpcije/desorpcije

Vrsta tla	Područje pH (u 0,01 M $CaCl_2$)	Sadržaj organskog ugljika (%)	Sadržaj gline (%)	Tekstura tla (1)
1	4,5 – 5,5	1,0 – 2,0	65 – 80	glina
2	> 7,5	3,5 – 5,0	20 – 40	glinasta ilovača
3	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	praškasta ilovača
4	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	ilovača
5	< 4,0 – 6,0 (2)	< 0,5 – 1,5 (2) (3)	< 10 – 15 (2)	ilovasti pijesak
6	> 7,0	< 0,5 – 1, 0 (2) (3)	40 – 65	glinasta ilovača/glina
7	< 4,5	> 10	< 10	pijesak/ilovasti pijesak

(1) U skladu sa sustavom FAO i američkim sustavom (85).
(2) Vrijedosti varijabli trebaju se po mogućnosti nalaziti unutar zadanog područja. Ipak, ako pronalaženje odgovarajućeg materijala predstavlja problem, prihvaćaju se i vrijednosti ispod navedenog minimuma.
(3) Tla s manje od 0,3 % organskog ugljika mogu poremetiti korelaciju između organskog sadržaja i adsorpcije. Stoga se preporučuje koristiti tla sa sadržajem organskog ugljika od najmanje 0,3 %.

1.7.3. **Skupljanje i čuvanje uzoraka tla**

1.7.3.1. *Skupljanje*

Ne postoje preporučene tehnike niti alati za uzorkovanje: tehnika uzorkovanja ovisi o svrsi istraživanja (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Treba uzeti u obzir sljedeće:

(a) potrebne su detaljne informacije o povijesti lokaliteta, uključujući mjesto, vegetacijski pokrov, tretiranje pesticidima i/ili gnojivima, biološke dodatke i slučajna onečišćenja. Treba poštovati preporuke standarda ISO za uzorkovanje tla (ISO 10381-6) s obzirom na opis mjesta uzorkovanja;

(b) mjesto uzorkovanja mora biti definirano UTM-om (univerzalna poprečna Mercatorova projekcija/European Horizontal Datum) ili geografskim koordinatama; to omogućuje ponovno skupljanje određenog tla u budućnosti i može pomoći da se tlo definira u okviru različitih sustava razvrstavanja koji se koriste u različitim zemljama. Osim toga, treba skupljati samo horizont A do dubine od najviše 20 cm. Ako je kao dio tla prisutan horizont O_h, njega treba uključiti u uzorak, posebno kod vrste tla pod br. 7.

Uzorke tla treba prenositi u spremnicima u temperaturnim uvjetima koji jamče da se početna svojstva tla neće značajno promijeniti.

▼B

1.7.3.2. *Skladištenje*

Poželjno je koristiti tla koja su svježe skupljena na terenu. Samo ako to nije moguće, tlo se može skladištiti na okolnoj temperaturi i treba ga održavati zrakosuhim. Ne postoji preporučeno ograničenje vremena skladištenja, ali tla koja se skladište duže od tri godine treba prije uporabe ponovno analizirati s obzirom na sadržaj organskog ugljika, pH i kapacitet izmjene kationa.

1.7.3.3. *Rukovanje i priprema uzoraka tla za ispitivanje*

Tla se suše na zraku na okolnoj temperaturi (po mogućnosti između 20 – 25 °C). Rahljenje treba obaviti uz minimalnu primjenu sile kako bi se što bolje sačuvala izvorna tekstura tla. Tla se prosijavaju na veličinu čestica $\leq$ 2 mm; što se tiče postupka prosijavanja, treba poštovati preporuke standarda ISO za uzorkovanje tla (ISO 10381-6). Preporučuje se pažljiva homogenizacija jer to povećava obnovljivost rezultata. Sadržaj vlage pojedinog tla određuje se na tri alikvota uz zagrijavanje na 105 °C do trenutka kad više nema značajnih promjena mase (približno 12 sati). Masa tla se kod svih izračuna odnosi na suhu masu nakon sušenja u sušioniku tj. masa tla ispravljena za sadržaj vlage.

1.7.4. **Priprema ispitivane tvari za primjenu na tlo**

Ispitivana tvar se otopi u otopini 0,01 M $CaCl_2$ u destiliranoj ili deioniziranoj vodi; otopina $CaCl_2$ se koristi kao faza vodenog otapala radi poboljšanja centrifugiranja i smanjenja izmjene kationa. Poželjno je da koncentracija radne otopine bude tri reda veličine viša od granice detekcije primijenjene analitičke metode. Ovaj prag jamči točna mjerenja s obzirom na metodologiju koja se primjenjuje kod ove metode; osim toga, koncentracija radne otopine treba biti niža od topljivosti ispitivane tvari u vodi.

Radnu otopinu po mogućnosti treba pripremiti neposredno prije primjene na uzorke tla i treba je držati zatvorenu u mraku na 4 °C. Vrijeme skladištenja ovisi o stabilnosti ispitivane tvari i njezinoj koncentraciji u otopini.

Ako se ispitivana tvar teško otapa, ponekad je potrebno primijeniti sredstvo za otapanje, ali samo u slučaju slabo topljivih tvari ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}). To sredstvo za otapanje: (a) treba biti mješljivo s vodom, npr. metanol ili acetonitril; (b) njegova koncentracija ne smije biti viša od 1 % ukupnog volumena radne otopine i treba biti manja od toga u otopini ispitivane tvari koja dolazi u dodir s tlom (po mogućnosti manja od 0,1 %); i (c) ne smije biti površinski aktivna tvar niti ulaziti u solvolitičke reakcije s ispitivanom kemikalijom. Uporabu sredstva za otapanje treba navesti zajedno s ostalim podacima i obrazložiti.

Druga mogućnost kod slabo topljivih tvari je dodavanje ispitivane tvari u ispitni sustav spikingom: ispitivana se tvar otopi u organskom otapalu i alikvot doda u sustav tla i otopine 0,01 M $CaCl_2$ u destiliranoj ili deioniziranoj vodi. Treba nastojati da sadržaj organskog otapala u vodenoj fazi bude što niži, u pravilu ne viši od 0,1 %. Kod spikinga iz organske otopine može se pojaviti problem neobnovljivosti volumena. To može rezultirati dodatnom greškom budući da koncentracija ispitivane tvari i pomoćnog otapala neće biti jednaka kod svih ispitivanja.

▼B

1.8. PREDUVJETI ZA PROVOĐENJE ISPITIVANJA ADSORPCIJE/ DESORPCIJE

1.8.1. **Analitička metoda**

Ključni parametri koji mogu utjecati na točnost sorpcijskih mjerenja su točnost analitičke metode kod analiziranja faze otopine i adsorbiranih faza, stabilnost i čistoća ispitivane tvari, uspostava sorpcijske ravnoteže, veličina promjene koncentracije otopine, omjer tlo/otopina i promjene u strukturi tla tijekom postupka za uspostavljanje ravnoteže (35)(59-62). Neki primjeri vezani uz problematiku točnosti navedeni su u Dodatku 2.

Pouzdanost analitičke metode treba provjeriti u rasponu koncentracija koji se očekuje tijekom ispitivanja. Izvođaču pokusa ostavljena je sloboda da sam izradi prikladnu metodu koja ima potrebnu točnost, preciznost, obnovljivost, granice detekcije i iskorištenje. Određene smjernice za provođenje takvog ispitivanja daje pokus u nastavku.

Prikladan volumen 0,01 M $CaCl_2$, npr. 100 cm^3, trese se s određenom masom jako adsorptivnog tla (tj. s visokim sadržajem organskog ugljika i gline), npr. 20 g, u vremenu od 4 sata; te mase i volumeni mogu biti različiti ovisno o analitičkim potrebama, s time da se kao praktično polazište može uzeti omjer tlo/otopina 1:5. Smjesa se centrifugira, a vodena faza se može i filtrirati. U vodenu se fazu doda određeni volumen radne otopine ispitivane tvari kako bi se postigla nazivna koncentracija unutar očekivanog raspona koncentracija tijekom ispitivanja. Taj volumen ne smije biti viši od 10 % konačnog volumena vodene faze kako bi se promjene svojstava otopine prije uspostave ravnoteže svele na najmanju moguću mjeru. Otopina se analizira.

U ispitivanje treba uključiti jednu slijepu probu sa sustavom tlo + otopina $CaCl_2$ (bez ispitivane tvari) radi otkrivanja mogućih artefakata u analitičkoj metodi i utjecaja matriksa koji potječu od tla.

Analitičke metode koje se mogu koristiti za sorpcijska mjerenja uključuju plinsko-tekućinsku kromatografiju (GLC), tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), spektrometriju (npr. GC/spektrometrija masa, HPLC/spektrometrija masa) i brojenje metodom tekućinske scintilacije (za radioaktivno obilježene tvari). Analitička metoda se smatra prikladnom ako se iskorištenje kreće između 90 % i 110 % nazivne vrijednosti, neovisno o tome koja se analitička metoda koristi. Da bi se omogućila detekcija i ocjenjivanje nakon razdiobe, granice detekcije analitičke metode moraju biti barem dva reda veličine niže od nazivne koncentracije.

Kod provođenja adsorpcijskih istraživanja svojstva i granice detekcije raspoložive analitičke metode igraju važnu ulogu u definiranju ispitnih uvjeta i općenito provođenju čitavog postupka ispitivanja. Ova metoda zacrtava opći okvir pokusnog postupka te donosi preporuke i smjernice u pogledu alternativnih rješenja u slučaju ograničenja analitičke metode ili laboratorijskih sredstava.

▼B

1.8.2. **Odabir optimalnih omjera tlo/otopina**

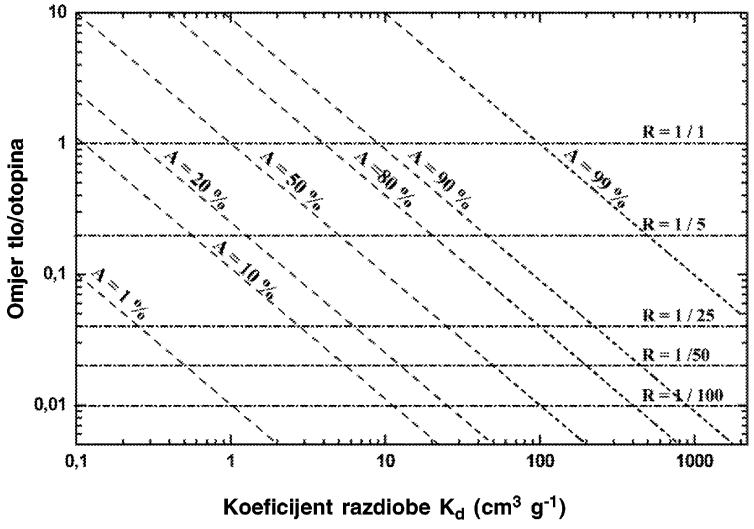
Odabir omjera tlo/otopina za sorpcijska istraživanja ovisi o koeficijentu razdiobe K_d i željenom relativnom stupnju adsorpcije. S obzirom na oblik jednadžbe adsorpcije i ograničenja analitičke metodologije vezana uz određivanje koncentracije kemikalije u otopini, promjena koncentracije tvari u otopini određuje statističku točnost mjerenja. Stoga je u praksi općenito korisno odabrati nekoliko fiksnih omjera kod kojih je postotak adsorpcije viši od 20 %, a po mogućnosti i viši od 50 % (62), pazeći da koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi ostane dovoljno visoka da se može točno izmjeriti. Ovo je posebno važno u slučaju visokih postotaka adsorpcije.

Praktičan pristup odabiru omjera tlo/otopina je pristup utemeljen na procjeni vrijednosti K_d, koja se može procijeniti u preliminarnom istraživanju ili putem prihvaćenih tehnika procjene (Dodatak 3.). Prikladan omjer se zatim može odabrati na temelju grafičkog prikaza omjera tlo/otopina u ovisnosti o K_d za fiksne postotke adsorpcije (Slika 1.). Pretpostavka ovoga grafičkog prikaza je da je jednadžba adsorpcije linearna ([1]). Primjenljivi se odnos dobije preuređivanjem jednadžbe (4) K_d u obliku jednadžbe (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(ec)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ili u njezinom logaritamskom obliku uz pretpostavku da je $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{ec}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{ec}\%/100}{1 - A_{ec}\%/100}\right] \qquad (2)$$



Slika 1. Odnos između omjera tlo/otopina i K_d pri različitim postocima adsorpcije ispitivane tvari

([1]) $C_s^{ads}(ec) = K_d \cdot C_{ap}^{ads}(ec)$.

▼B

Na slici 1. prikazani su potrebni omjeri tlo/otopina kao funkcija K_d za različite razine adsorpcije. Primjerice, ako je omjer tlo/otopina 1:5 i K_d je 20, dobije se adsorpcija od približno 80 %. Da bi se dobila 50 %-tna adsorpcija, za isti K_d, treba koristiti omjer 1:25. Ovaj pristup istraživaču pruža slobodu da odabere omjer tlo/otopina u skladu s potrebama pokusa.

Nešto veći problem predstavlja situacija kad se kemikalija jako ili tek neznatno adsorbira. U slučaju niske adsorpcije, preporučuje se omjer tlo/otopina 1:1, iako su kod nekih vrsta izrazito organskih tala potrebni manji omjeri da bi se dobila kaša. Analitička metodologija mora omogućivati mjerenje malih promjena koncentracije otopine; u protivnom će mjerenje adsorpcije biti netočno. S druge strane, kod jako visokih koeficijenata razdiobe K_d mogu se uzeti i omjeri tlo/otopina do čak 1:100, kako bi u otopini ostala značajna količina kemikalije. Međutim, treba voditi računa da se postigne dobro miješanje i ostaviti dovoljno vremena za uspostavu ravnoteže u sustavu. Alternativni pristup u ovim ekstremnim slučajevima kada ne postoji odgovarajuća analitička metodologija je predviđanje vrijednosti K_d primjenom tehnika procjene npr. na temelju vrijednosti P_{ow} (Dodatak 3.). To može biti korisno posebno kod slabo apsorbiranih/polarnih kemikalija s $P_{ow} < 20$ i kod lipofilnih/visoko sorptivnih kemikalija s $P_{ow} > 10^4$.

1.9. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.9.1. **Ispitni uvjeti**

Svi se pokusi provode na okolnoj temperaturi i to po mogućnosti na stalnoj temperaturi između 20 °C i 25 °C.

Uvjeti centrifugiranja trebaju omogućivati uklanjanje čestica većih od 0,2 μm iz otopine. Ta vrijednost predstavlja veličinu najsitnije čestice koja se smatra krutom česticom i čini granicu između krutih i koloidnih čestica. Smjernice za određivanje uvjeta centrifugiranja dane su u Dodatku 4.

Ako naprave za centrifugiranje ne mogu zajamčiti uklanjanje čestica većih od 0,2 μm, treba primjenjivati kombinaciju centrifugiranja i filtriranja s filtrima od 0,2 μm. Ti filtri trebaju biti izrađeni od prikladnog inertnog materijala kako bi se izbjegli gubici ispitivane tvari na njima. U svakom slučaju, treba dokazati da tijekom filtriranja ne dolazi do gubitaka ispitivane tvari.

1.9.2. **1. razina – preliminarno istraživanje**

Svrha provedbe preliminarnog istraživanja već je navedena u odjeljku Područje primjene. Smjernice za postavljanje takvih ispitivanja nalaze se u prijedlogu pokusa u nastavku.

1.9.2.1. *Odabir optimalnih omjera tlo/otopina*

Koriste se dvije vrste tla i tri omjera tlo/otopina (šest pokusa). Jedna vrsta tla ima visok sadržaj organskog ugljika i nizak sadržaj gline, a druga ima nizak sadržaj organskog ugljika i visok sadržaj gline. Predlažu se sljedeći omjeri tla i otopine:

— 50 g tla i 50 cm^3 vodene otopine ispitivane tvari (omjer 1/1),

▼B

— 10 g tla i 50 cm^3 vodene otopine ispitivane tvari (omjer 1/5),

— 2 g tla i 50 cm^3 vodene otopine ispitivane tvari (omjer 1/25).

Najmanja količina tla na kojoj se može izvesti pokus ovisi o laboratorijskim sredstvima i učinkovitosti analitičkih metoda koje se primjenjuju. Ipak, preporučuje se korištenje najmanje 1 g, a po mogućnosti i 2 g, kako bi se ispitivanjem dobili pouzdani rezultati.

Jedan kontrolni uzorak koji sadrži samo ispitivanu tvar u otopini 0,01 M $CaCl_2$ (bez tla) podvrgava se potpuno istim postupcima kao ispitni sustavi kako bi se provjerila stabilnost ispitivane tvari u otopini $CaCl_2$ i njezina moguća adsorpcija na površinu ispitnih posuda.

Istom ispitnom postupku podvrgava se po jednu slijepu probu za svako tlo s istom količinom tla i ukupnim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$ od 50 cm^3 (bez ispitivane tvari). Ona kod analize služi kao temeljna kontrola za utvrđivanje interferirajućih tvari i onečišćenih tala.

Sve pokuse, uključujući kontrole i slijepe probe, treba provoditi barem u dva ponavljanja. Ukupni broj uzoraka koje je potrebno pripremiti za istraživanje može se izračunati s obzirom na metodologiju koja se primjenjuje.

Metode za preliminarno i glavno istraživanje su općenito iste, a izuzeci se navode tamo gdje se primjenjuju.

Zrakom sušeni uzorci tla se u noći prije pokusa (12 sati) ekvilibriraju tresenjem s najmanje 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Zatim se doda količina radne otopine ispitivane tvari potrebna da se dobije konačni volumen od 50 cm^3. Volumen radne otopine koji se dodaje (a) ne smije biti viši od 10 % konačnog volumena vodene faze od 50 cm^3, kako bi se promjene svojstava otopine prije uspostave ravnoteže svele na najmanju moguću mjeru; i (b) treba omogućiti da početna koncentracije ispitivane tvari u dodiru s tlom (C_0) bude najmanje dva reda veličine viša od granice detekcije analitičke metode; ovaj prag osigurava provedbu točnih mjerenja čak i u slučaju snažne adsorpcije (> 90 %), a kasnije i određivanje adsorpcijskih izotermi. Također se preporučuje da početna koncentracija tvari (C_0) po mogućnosti ne bude viša od polovice njezine granice topljivosti.

U nastavku se nalazi primjer izračuna koncentracije radne otopine (C_{st}). Pretpostavlja se granica detekcije 0,01 μg cm^{-3} i 90 %-tna adsorpcija; prema tomu, bilo bi poželjno da početna koncentracija ispitivane tvari u dodiru s tlom bude 1 μg cm^{-3} (dva reda veličine viša od granice detekcije). Ako se doda najviši preporučeni volumen radne otopine tj. od 5 do 45 cm^3 ekvilibracijske otopine 0,01 M $CaCl_2$ (= 10 % radne otopine na ukupni volumen vodene faze od 50 cm^3), koncentracija radne otopine trebala bi biti 10 μg cm^{-3}; to je tri reda veličine više od granice detekcije analitičke metode.

pH vodene faze treba izmjeriti prije i nakon dodira s tlom, budući da on igra važnu ulogu u čitavom procesu adsorpcije, posebno kod ionizirajućih tvari.

▼B

Smjesa se trese dok se ne postigne adsorpcijska ravnoteža. Ravnotežno vrijeme je vrlo promjenljivo, ovisno o kemikaliji i tlu; općenito je dostatno vrijeme od 24 sata (77). U preliminarnom istraživanju uzorci se mogu uzimati u određenom slijedu u razdoblju miješanja od 48 sati (primjerice nakon 4, 8, 24, 48 sati). Ipak, vremena analize treba odrediti fleksibilno, ovisno o radnom rasporedu laboratorija.

Za analiziranje ispitivane tvari u vodenoj otopini raspoložive su dvije mogućnosti: (a) paralelna metoda i (b) serijska metoda. Treba naglasiti da je paralelna metoda doduše sporija u pokusnom dijelu, ali je matematička obrada rezultata jednostavnija (Dodatak 5.). Ipak, izbor metodologije ovisi o izvođaču pokusa, koji mora uzeti u obzir raspoloživa laboratorijska sredstva i resurse.

(a) Paralelna metoda: pripremi se potreban broj uzoraka s jednakim omjerom tlo/otopina, koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima se želi proučavati kinetika adsorpcije. Nakon centrifugiranja i, po želji, filtriranja treba što potpunije povratiti vodenu fazu iz prve epruvete i izmjeriti nakon npr. 4 sata; vodena faza iz druge epruvete mjeri se nakon 8 sati, treću nakon 24 sata itd.

(b) Serijska metoda: pripreme se samo po dva uzorka za svaki omjer tlo/otopina. Smjesa se u definiranim vremenskim razmacima centrifugira radi odvajanja faza. Mali alikvot vodene faze se odmah analizira na ispitivanu tvar; pokus se zatim nastavlja s prvobitnom smjesom. Ako se nakon centrifugiranja primjenjuje filtracija, laboratrij mora imati opremu za filtriranje malih vodenih alikvota. Preporučuje se da ukupni volumen alikvota ne bude viši od 1 % ukupnog volumena otopine, kako ne bi došlo do značajne promjene omjera tlo/otopina i kako se ne bi smanjila masa otopljene tvari raspoloživa za adsorpciju tijekom ispitivanja.

Izračuna se postotak adsorpcije (A_{t_i}) u svakom vremenu (t_i) na temelju početne nazivne koncentracije i izmjerene koncentracije u vremenu uzorkovanja (t_i), ispravljen za vrijednost slijepe probe. Izrade se grafički prikazi (A_{t_i}) u ovisnosti o vremenu (Dodatak 5. Slika 1.) kako bi se mogla procijeniti uspostava ravnotežnog platoa ([1]). Također se izračuna vrijednost K_d u ravnoteži. Na temelju te vrijednosti K_d se iz slike 1. odaberu odgovarajući omjeri tlo/otopina tako da postotak adsorpcije bude viši od 20 %, a po mogućnosti i > 50 % (61). Sve primjenljive jednadžbe i načela grafičkog prikazivanja navedeni su u odjeljku Podaci i izvješćivanje i u Dodatku 5.

1.9.2.2. *Određivanje vremena do uspostavljanja adsorpcijske ravnoteže i količine ispitivane tvari adsorbirane u ravnoteži*

Kao što je već spomenuto, grafički prikazi A_{t_i} ili (C_{aq}^{ads}) u vremenu omogućuju procjenu uspostave adsorpcijske ravnoteže i količine ispitivane tvar adsorbirane u ravnoteži. Primjeri takvih grafičkih prikaza su slika 1. i 2. u Dodatku 5. Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže je vrijeme potrebno da sustav dosegne plato.

([1]) Za procjenu uspostave ravnotežnog platoa također se mogu koristiti grafički prikazi koncentracije ispitivane tvari u vodenoj fazi (C_{ap}^{ads}) u ovisnosti o vremenu (vidjeti Dodatak 5. Sliku 2.).

▼B

Ako se kod određenog tla ne može utvrditi plato, već je vidljivo stalno povećanje, to može biti zbog otežavajućih čimbenika, kao što je biorazgradnja ili spora difuzija. Biorazgradnja se može dokazati ponavljanjem pokusa sa steriliziranim uzorkom tla. Ako se ni u tom slučaju ne dosegne plato, izvođač pokusa treba potražiti druge specifične pojave koje bi mogle biti prisutne u njegovom istraživanju; to se može učiniti odgovarajućim izmjenama pokusnih uvjeta (temperatura, vrijeme tresenja, omjeri tlo/otopina). Odluka o nastavku ispitnog postupka unatoč eventualnom izostanku ravnoteže prepuštena je izvođaču pokusa.

1.9.2.3. *Adsorpcija na površini ispitne posude i stabilnost ispitivane tvari*

Neke informacije o adsorpciji ispitivane tvari na površini ispitnih posuda i njezinoj stabilnosti mogu se dobiti analizom kontrolnih uzoraka. Ako se uoči gubitak viši od standardne greške analitičke metode, to može značiti da je došlo do abiotičke razgradnje i/ili adsorpcije na površinu ispitne posude. Razlika između tih dviju pojava može se utvrditi temeljitim pranjem stijenki posude poznatim volumenom prikladnog otapala i analiziranjem otopine od pranja na ispitivanu tvar. Ako nije uočena adsorpcija na površini ispitnih posuda, gubitak ukazuje na abiotičku nestabilnost ispitivane tvari. Ako se utvrdi adsorpcija, treba promijeniti materijal ispitnih posuda. Ipak, podaci o adsorpciji na površinu ispitnih posuda dobiveni ovim pokusom ne mogu se izravno ekstrapolirati na pokus tlo/otopina. Na ovu adsorpciju će utjecati prisutnost tla.

Dodatne informacije o stabilnosti ispitivane tvari mogu se dobiti određivanjem bilance mase polazne tvari u vremenu. To podrazumijeva analizu vodene faze, ekstrakata tla i stijenki ispitne posude na ispitivanu tvar. Razlika između upotrijebljene mase ispitivane kemikalije i zbroja masa ispitivane kemikalije u vodenoj fazi, ekstraktima tla i stijenki ispitne posude jednaka je razgrađenoj i/ili ishlapljeloj i/ili neekstrahiranoj masi. Da bi se odredila bilanca mase, u razdoblju pokusa mora biti postignuta adsorpcijska ravnoteža.

Bilanca mase određuje se na oba tla za jedan omjer tlo/otopina po tlu koji u ravnoteži pokazuje gubitak iznad 20 %, a po mogućnosti i > 50 %. Po završetku pokusa za određivanje omjera analizom zadnjeg uzorka vodene faze nakon 48 sati faze se odvajaju centrifugiranjem te, po želji, filtriranjem. Vodena faza se što je moguće više povrati i tlu doda prikladno ekstrakcijsko otapalo (koeficijent ekstrakcije najmanje 95 %) za ekstrakciju ispitivane tvari. Preporučuju se najmanje dvije uzastopne ekstrakcije. Zatim se odredi količina ispitivane tvari u ekstraktima tla i ispitnih posuda i izračuna bilanca mase (jednadžba 10, Podaci i izvješćivanje). Ako je ona manja od 90 %, smatra se da je ispitivana tvar nestabilna u vremenskom okviru ispitivanja. Istraživanje se unatoč tomu može nastaviti, ali pritom treba uzeti u obzir nestabilnost ispitivane tvari; u tom se slučaju preporučuje da se u sklopu glavnog istraživanja analiziraju obje faze.

▼B

1.9.3. *2. razina – kinetika adsorpcije s jednom koncentracijom ispitivane tvari*

Koristi se pet tala odabranih iz tablice 1. Ovdje je dobro uključiti neka ili sva tla koja su korištena u preliminarnom istraživanju, ako je to primjereno. U tom slučaju nije potrebno ponavljati 2. razinu za tla koja su korištena u preliminarnom istraživanju.

Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže, omjer tlo/otopina, masa uzorka tla, volumen vodene faze u dodiru s tlom i koncentracija ispitivane tvari u otopini odabiru se na temelju rezultata preliminarnog istraživanja. Analizu treba po mogućnosti provesti nakon vremena kontakta od približno 2, 4, 6, 8 (eventualno i 10) te 24 sata; vrijeme tresenja može se produžiti na najviše 48 sati u slučaju kemikalija koje zahtijevaju duže vrijeme do uspostavljanja ravnoteže, na temelju rezultata određivanja omjera. Ipak, vremena analize mogu se odrediti fleksibilno.

Svaki pokus (jedno tlo i jedna otopina) izvodi se najmanje u dva ponavljanja kako bi se mogla procijeniti varijanca rezultata. U svaki pokus treba uključiti po jednu slijepu probu. Ona se sastoji od tla i otopine 0,01 M $CaCl_2$ (bez ispitivane tvari) jednake mase odnosno volumena kao u pokusu. Kontrolni uzorak koji sadrži samo ispitivanu tvar u otopini 0,01 M $CaCl_2$ (bez tla) treba podvrgnuti istom ispitnom postupku radi zaštite u slučaju neočekivanih ishoda.

Postotak adsorpcije izračunava se u svakom vremenu A_{t_i} i/ili vremenskom intervalu $A_{\Delta t_i}$ (ovisno o potrebi) i treba ga grafički prikazati u ovisnosti o vremenu. Osim toga, izračunava se i koeficijent razdiobe K_d u ravnoteži kao i koeficijent adsorpcije normiran na organski ugljik K_{oc} (za nepolarne organske kemikalije).

Rezultati ispitivanja kinetike adsorpcije

Linearna vrijednost K_d općenito točno opisuje sorpcijsko ponašanje u tlu (35)(78) i predstavlja izraz svojstvene pokretljivosti kemikalije u tlu. Primjerice, kemikalije s $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$ općenito se smatraju kvalitativno pokretljivima. MacCall i sur. (16) izradili su sličan sustav razvrstavanja prema pokretljivosti na temelju vrijednosti K_{oc}. Osim toga, postoje i sustavi razvrstavanja s obzirom na ispiranje na temelju odnosa između K_{oc} i DT-50 ([1]) (32)(79).

Istraživanja u kojima je provedena analiza pogrešaka (61) pokazala su da se vrijednosti K_d ispod $0,3\ cm^3\ g^{-1}$ ne mogu točno procijeniti iz smanjenja koncentracije u vodenoj fazi, čak i ako se primijeni najpovoljniji (s gledišta točnosti) omjer tlo/otopina tj. 1:1. U tom slučaju se preporučuje analiza obiju faza, tla i otopine.

([1]) DT-50: vrijeme razgradnje 50 % ispitivane tvari.

▼B

Uzimajući u obzir gornje napomene, preporučuje se da se istraživanje adsorpcijskog ponašanja kemikalije u tlu i njezinog potencijala pokretljivosti nastavi određivanjem Freundlichovih adsorpcijskih izotermi za ove sustave kod kojih je moguće točno odrediti K_d u skladu s pokusnim protokolom ove ispitne metode. Točno je određivanje moguće ako je vrijednost koja se dobije množenjem K_d s omjerom tlo/otopina > 0,3, ako se mjerenja temelje na smanjenju koncentracije u vodenoj fazi (neizravna metoda), ili > 0,1, ako se analiziraju obje faze (izravna metoda) (61).

1.9.4. *3. razina – adsorpcijske izoterme i kinetika desorpcije/desorpcijske izoterme*

1.9.4.1. Adsorpcijske izoterme

Koristi se pet koncentracija ispitivane tvari, koje po mogućnosti obuhvaćaju dva reda veličine; kod izbora tih koncentracija treba uzeti u obzir topljivost u vodi i ravnotežne koncentracije u vodi koje iz tog proizlaze. Omjer tlo/otopina po tlu ne smije se promijeniti tijekom istraživanja. Ispitivanje adsorpcije provodi se na način kako je gore opisano, uz jedinu razliku što se vodena faza analizira samo jedanput u vremenu koje je potrebno da se postigne ravnoteža, kako je određeno gore u 2. razini. Odrede se ravnotežne koncentracije u otopini i izračuna adsorbirana količina na temelju gubitaka ispitivane tvari u otopini ili izravnom metodom. Adsorbirana masa po jedinici mase tla grafički se prikaže kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitvane tvari (vidjeti Podaci i izvješćivanje).

Rezultati pokusa s adsorpcijskim izotermama

Freundlichova izoterma je model koji se od svih do sada predloženih matematičkih modela adsorpcije najčešće koristi za opisivanje adsorpcijskih procesa. Detaljnije informacije o tumačenju i važnosti modela adsorpcije mogu se naći u referencama (41)(45)(80)(81)(82).

Napomena: Valja spomenuti da je usporedba vrijednosti K_F (Freundlichov koeficijent adsorpcije) za različite tvari moguća samo ako su vrijednosti K_F izražene u istim jedinicama (83).

1.9.4.2. Kinetika desorpcije

Svrha ovog pokusa je utvrditi je li adsorpcija kemikalije na tlo reverzibilna ili ireverzibilna. Ovaj je podatak važan jer proces desorpcije također igra važnu ulogu u ponašanju kemikalije u tlu. Osim toga, podaci o desorpciji korisni su kod računalnog modeliranja ispiranja i simulacije otjecanja otopljenih tvari. Ako se želi provesti istraživanje desorpcije, preporučuje se da se niže opisano istraživanje provede na svakom sustavu za koji je bilo moguće točno odrediti K_d u prethodnom pokusu s kinetikom adsorpcije.

Kao kod istraživanja kinetike adsorpcije, postoje dvije mogućnosti izvođenja pokusa s kinetikom desorpcije: (a) paralelna metoda i (b) serijska metoda. Izbor metodologije prepušten je izvođaču pokusa, koji treba uzeti u obzir raspoloživa laboratorijska sredstva i resurse.

▼B

(a) Paralelna metoda: za svako odabrano tlo na kojemu će se provesti istraživanje desorpcije pripremi se potreban broj uzoraka s jednakim omjerom tlo/otopina koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima će se proučavati kinetika desorpcije. Po mogućnosti treba koristiti iste vremenske intervale kao kod pokusa s kinetikom adsorpcije; ipak, ukupno se vrijeme može prema potrebi produžiti kako bi sustav postigao desorpcijsku ravnotežu. U svaki pokus (jedno tlo, jedna otopina) treba uključiti po jednu slijepu probu. Ona se sastoji od tla i otopine 0,01 M $CaCl_2$, bez ispitivane tvari, jednake mase i volumena kao u pokusu. Kontrolni uzorak s ispitivanom tvari u otopini 0,01 M $CaCl_2$ (bez tla) podvrgava se istom ispitnom postupku. Sve smjese tla i otopine tresu se dok se ne postigne adsorpcijska ravnoteža (kako je određeno gore u 2. razini). Zatim se faze odvoje centrifugiranjem i vodene faze se što je moguće više uklone. Volumen uklonjene otopine zamijeni se jednakim volumenom 0,01 M $CaCl_2$ bez ispitivane tvari i nove se smjese ponovno tresu. Vodena faza iz prve epruvete se što potpunije povrati i izmjeri nakon npr. 2 sata, vodena faza iz druge epruvete mjeri se nakon 4 sata, treće nakon 6 sati itd. dok se ne postigne desorpcijska ravnoteža.

(b) Serijska metoda: smjesa se nakon pokusa s kinetikom adsorpcije centrifugira i vodena faza se što je moguće više ukloni. Volumen uklonjene otopine zamijeni se jednakim volumenom 0,01 M $CaCl_2$ bez ispitivane tvari. Nova se smjesa trese do uspostave desorpcijske ravnoteže. Za to se vrijeme smjesa u definiranim vremenskim razmacima centrifugira radi odvajanja faza. Mali alikvot vodene faze se odmah analizira na ispitivanu tvar; zatim se pokus nastavlja s izvornom smjesom. Volumen pojedinačnih alikvota treba biti manji od 1 % ukupnog volumena. Smjesi se doda ista količina svježe otopine 0,01 M $CaCl_2$ radi održavanja omjera tla i otopine te se nastavi s tresenjem do sljedećeg intervala.

Postotak desorpcije izračuna se u svakom vremenu (D_{t_i}) i/ili vremenskom intervalu ($D_{\Delta t_i}$) (ovisno o potrebama istraživanja) i grafički se prikaže u ovisnosti o vremenu. Osim toga, izračuna se i koeficijent desorpcije K_{des} u ravnoteži. Sve primjenljive jednadžbe navedene su u odjeljku Podaci i izvješćivanje i Dodatku 5.

Rezultati pokusa s kinetikom desorpcije

Zajednički grafički prikaz postotka desorpcije D_{t_i} i adsorpcije A_{t_i} u ovisnosti o vremenu omogućuje procjenu reverzibilnosti procesa adsorpcije. Ako se postigne desorpcijska ravnoteža, makar i u dvostruko dužem vremenu u odnosu na adsorpcijske ravnoteže, i ako je ukupna desorpcija viša od 75 % adsorbirane količine, adsorpcija se smatra reverzibilnom.

1.9.4.3. Desorpcijske izoterme

Freundlichove desorpcijske izoterme određuju se na tlima koja su korištena u pokusu za određivanje adsorpcijskih izotermi. Ispitivanje desorpcije provodi se na način kako je opisano u odjeljku „Kinetika desorpcije”, s jedinom razlikom što se vodena faza analizira samo jedanput – u desorpcijskoj ravnoteži. Izračuna se desorbirana količina ispitivane tvari. Sadržaj ispitivane tvari koji ostane adsorbiran na tlu u desorpcijskoj ravnoteži grafički se prikazuje kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitivane tvari u otopini (vidjeti odjeljak Podaci i izvješćivanje i Dodatak 5.).

▼B

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

Analitički se podaci prikažu u tabličnom obliku (vidjeti Dodatak 6.). Navedu se pojedinačna mjerenja i izračunane prosječne vrijednosti. Prilože se grafički prikazi adsorpcijskih izotermi. Izračuni se provode na način kako je opisano u nastavku.

Za potrebe ovog ispitivanja smatra se da je masa 1 cm^3 vodene otopine 1 g. Omjer tlo/otopina može se izraziti u jedinicama w/w ili w/v na istom grafu.

2.1. ADSORPCIJA

Adsorpcija A_{t_i} definirana je kao postotak tvari adsorbiran na tlo u ispitnim uvjetima u odnosu na količinu koja je bila prisutna na početku ispitivanja. Ako je ispitivana tvar stabilna i ne adsorbira se značajno na stijenki posude, A_{t_i} u svakom vremenu t_i izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

gdje je:

A_{ti} = postotak adsorpcije u vremenu t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo u vremenu t_i (μg);

m_0 = masa ispitivane tvari u epruveti na početku ispitivanja (μg).

Detaljne informacije za izračunavanje postotka adsorpcije A_{t_i} za paralelnu i serijsku metodu nalaze se u Dodatku 5.

Koeficijent razdiobe K_d je omjer sadržaja tvari u fazi tla i masene koncentracije tvari u vodenoj otopini u ispitnim uvjetima kad se postigne adsorpcijska ravnoteža.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(ec)}{C_{ap}^{ads}(ec)} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{ap}^{ads}(ec)} \cdot \frac{V_0}{m_{sol}} \ (cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

gdje je:

$C_s^{ads}(ec)$ = sadržaj tvari adsorbiran na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži (μg g^{-1})

$C_{ap}^{ads}(ec)$ = masena koncentracija tvari u vodenoj fazi u adsorpcijskoj ravnoteži (μg cm^{-3}). Ova se koncentracija određuje analitički, uzimajući u obzir vrijednosti slijepih proba

$m_s^{ads}(ec)$ = masa tvari adsorbirana na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa tvari u otopini u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

m_{soil} = količina faze tla, izražena u suhoj masi tla (g)

V_0 = početni volumen vodene faze u dodiru s tlom (cm^3)

Odnos između A_{eq} i K_d iskazuje se kao:

$$K_d = \frac{A_{ec}}{100 - A_{ec}} \cdot \frac{V_0}{m_{sol}} \ (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

gdje je:

A_{eq} = postotak adsorpcije u adsorpcijskoj ravnoteži (%)

Koeficijent adsorpcije normiran na organski ugljik K_{oc} uspostavlja odnos između koeficijenta razdiobe K_d i sadržaja organskog ugljika u uzorku tla:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%CO} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (6)$$

gdje je:

%OC = postotak organskog ugljika u uzorku tla (g g^{-1})

Koeficijent K_{oc} je pojedinačna vrijednost koja opisuje razdiobu uglavnom nepolarnih organskih kemikalija između organskog ugljika u tlu ili sedimentu i vode. Adsorpcija tih kemikalija stavlja se u korelaciju s organskim sadržajem sorbirajuće krute tvari (7); prema tomu, vrijednosti K_{oc} ovise o specifičnim svojstvima huminskih frakcija koje se značajno razlikuju po sorpcijskoj sposobnosti zbog razlika u podrijetlu, genezi itd.

2.1.1. **Adsorpcijske izoterme**

Jednadžba Freundlichovih adsorpcijskih izotermi uspostavlja odnos između adsorbirane količine ispitivane tvari i koncentracije ispitivane tvari u otopini u ravnoteži (jednadžba (8)).

Podaci se obrade kako je prikazano u odjeljku „Adsorpcija” i za svaku se epruvetu izračuna sadržaj ispitivane tvari adsorbiran na tlo nakon adsorpcijskog testa $C_s^{ads}(ec)$, koji se drugdje označava kao x/m). Pretpostavlja se da je ravnoteža uspostavljena i da $C_s^{ads}(ec)$ predstavlja ravnotežnu vrijednost:

$$C_s^{ads}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{sol}} = \frac{\left[C_0 - C_{ap}^{ads}(ec)\right].V_0}{m_{sol}} \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (7)$$

Freundlichova adsorpcijska jednadžba prikazana je u (8):

$$C_s^{ads}(ec) = K_F^{ads}.C_{ap}^{ads}(ec)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (8)$$

ili u linearnom obliku:

$$\log C_s^{ads}(ec) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{ads}(ec) \qquad (9)$$

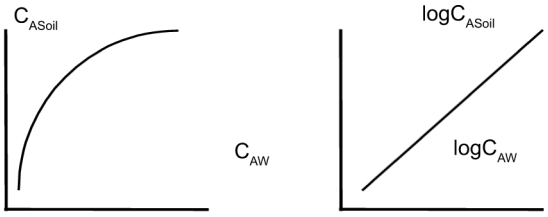
gdje je:

K_F^{ads} = Freundlichov koeficijent adsorpcije; njegova je dimenzija $cm^3\ g^{-1}$, ali samo ako je 1/n = 1; u svim drugim slučajevima u dimenziji K_F^{ads} uvodi se nagib 1/n ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$)

n = regresijska konstanta; 1/n se obično kreće u području od 0,7 – 1,0 i ukazuje na to da su podaci o sorpciji često blago nelinearni

Jednadžbe (8) i (9) prikažu se grafički te se izračunaju vrijednosti K_F^{ads} i 1/n regresijskom analizom pomoću jednadžbe (9). Također se izračuna koeficijent korelacije r^2 logaritamske jednadžbe. Primjer takvoga grafa prikazan je na slici 2.

▼B



Slika 2. Freundlichov graf adsorpcije, obični i linearizirani

2.1.2. **Bilanca mase**

Bilanca mase (MB) definirana je kao postotak tvari koji se može analitički izdvojiti nakon adsorpcijskog testa u odnosu na nazivnu količinu tvari na početku ispitivanja.

Obrada podataka razlikuje se ovisno o tomu je li otapalo u potpunosti mješljivo s vodom ili ne. U slučaju otapala mješljivih s vodom, za određivanje količine tvari izdvojene putem ekstrakcije otapalom može se primijeniti obrada podataka opisana u odjeljku „Desorpcija”. Ako je otapalo manje mješljivo s vodom, potrebno je odrediti izdvojenu količinu.

Bilanca mase MB za adsoprciju izračunava se kako je opisano u nastavku; polazi se od pretpostavke da izraz (m_E) odgovara zbroju masa ispitivane kemikalije ekstrahiranih iz tla i s površine ispitne posude organskim otapalom:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \quad (10)$$

gdje je:

MB = bilanca mase (%)

m_E = ukupna masa ispitivane tvari ekstrahirana iz tla i sa stijenki ispitne posude u dva koraka (μg)

C_0 = početna masena koncentracija ispitne otopine u dodiru s tlom (μg cm^{-3})

V_{rec} = volumen supernatanta dobiven nakon adsorpcijske ravnoteže (cm^{-3})

2.2. DESORPCIJA

Desorpcija (D) se definira kao postotak ispitivane tvari desorbiran u ispitnim uvjetima u odnosu na količinu tvari koja je prethodno adsorbirana:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

gdje je:

D_{ti} = postotak desorpcije u vremenu t_i (%)

▼B

$m_{ap}^{des}(t_i)$ = masa ispitivane tvari desorbirana iz tla u vremenu t_i (μg)

$m_s^{ads}(ec)$ = masa ispitivane tvari adsorbirana na tlu u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

Detaljne informacije za izračunavanje postotka desorpcije D_{t_i} za paralelnu i serijsku metodu nalaze se u Dodatku 5.

Prividni koeficijent desorpcije (K_{des}) u ispitnim uvjetima je omjer sadržaja tvari koji je ostao u fazi tla i masene koncentracije desorbirane tvari u vodenoj otopini kad je postignuta desorpcijska ravnoteža:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{aq}^{des}(ec)\, V_T}{m_{ap}^{des}(ec) \qquad m_{sol}} \ (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

gdje je:

K_{des} = koeficijent desorpcije ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{ap}^{des}(ec)$ = ukupna masa ispitivane tvari desorbirana iz tla u desorpcijskoj ravnoteži (μg)

V_T = ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom tijekom ispitivanja kinetike desorpcije (cm^3)

Smjernice za izračun $m_{ap}^{des}(ec)$ navedene su u Dodatku 5. u rubrici „Desorpcija”.

Napomena:

Ako je prethodno ispitivanje adsorpcije provedeno paralelnom metodom, smatra se da je volumen V_T u jednadžbi (12) jednak V_0.

2.2.1. **Desorpcijske izoterme**

Jednadžba Freundlichovih desorpcijskih izotermi uspostavlja odnos između sadržaja ispitivane tvari koji ostaje adsorbiran na tlu i koncentracije ispitivane tvari u otopini u desorpcijskoj ravnoteži (jednadžba (16)).

Sadržaj tvari koji ostaje adsorbiran na tlu u desorpcijskoj ravnoteži izračunava se za svaku epruvetu na sljedeći način:

$$C_s^{des}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{sol}} \ (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{ap}^{des}(ec)$ je definiran kao:

$$m_{ap}^{des}(ec) = m_m^{des}(ec) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{ap}^{A}(\mu g) \tag{14}$$

gdje je:

$C_s^{des}(ec)$ = sadržaj ispitivane tvari koji ostaje adsorbiran na tlu u desorpcijskoj ravnoteži (μg g^{-1})

$m_m^{des}(ec)$ = masa tvari određena analitički u vodenoj fazi u desorpcijskoj ravnoteži (μg)

▼B

m_{ap}^{A} = masa ispitivane tvari preostala nakon adsorpcijske ravnoteže zbog nepotpune zamjene volumena (μg)

$m_{ap}^{des}(ec)$ = masa tvari u otopini u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

$$m_{ap}^{A} = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volumen otopine uzet iz epruvete u svrhu mjerenja ispitivane tvari u desorpcijskoj ravnoteži (cm^3)

V_R = volumen supernatanta uklonjen iz epruvete nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže i zamijenjen istim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3)

Freundlichova jednadžba desorpcije prikazana je u (16):

$$C_s^{des}(ec) = K_F^{des} \cdot C_{ap}^{des}(ec)^{1/n} (\mu g\ g - 1) \quad (16)$$

ili u linearnom obliku:

$$\log C_s^{des}(ec) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{ap}{}^{des}(ec) \quad (17)$$

gdje je:

K_F^{des} = Freundlichov koeficijent desorpcije

n = regresijska konstanta

$C_{ap}^{des}(ec)$ = masena koncentracija tvari u vodenoj fazi u desorpcijskoj ravnoteži (μg cm^{-3})

Jednadžbe (16) i (17) mogu se prikazati grafički, a vrijednosti $K_F{}^{des}$ i 1/n izračunavaju se regresijskom analizom uz pomoć jednadžbe (17).

Napomena:

Ako je Freundlichov eksponent adsorpcije ili desorpcije 1/n jednak 1, tada će Freundlichova adsorpcijska odnosno desorpcijska konstanta vezanja (K_F^{ads} i K_F^{des}) biti jednaka konstanti adsorpcijske odnosno desorpcijske ravnoteže (K_d i K_{des}) i grafovi C_s u ovisnosti o C_{aq} bit će linearni. Ako eksponenti nisu jednaki 1, grafovi C_s u ovisnosti o C_{aq} bit će nelinearni i konstante adsorpcije i desorpcije će varirati duž izotermi.

2.2.2. **Izvješće o ispitivanju**

Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće informacije:

— potpune podatke o uzorcima tla, uključujući:

— geografske koordinate lokaliteta (širina, dužina),

— datum uzorkovanja,

▼B

— način korištenja (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd.),

— dubinu uzorkovanja,

— sadržaj pijeska/praha/gline,

— pH vrijednosti (u 0,01 M CaCl2),

— sadržaj organskog ugljika,

— sadržaj organske tvari,

— sadržaj dušika,

— omjer C/N,

— kapacitet izmjene kationa (mmol/kg),

— sve informacije vezane uz skupljanje i skladištenje uzoraka tla,

— prema potrebi, sve relevantne informacije za tumačenje adsorpcije – desorpcije ispitivane tvari,

— uputu na metode korištene za određivanje pojedinih parametara,

— podatke o ispitivanoj tvari, prema potrebi,

— temperaturu pokusa,

— uvjete centrifugiranja,

— analitički postupak primijenjen za analizu ispitivane tvari,

— obrazloženje primjene sredstva za otapanje u pripremi radne otopine ispitivane tvari,

— objašnjenje korekcija izračuna, prema potrebi,

— podatke iz obrasca za dostavu podataka (Dodatak 6.) i grafičke prikaze,

— sve informacije i zapažanja korisna za tumačenje rezultata ispitivanja.

3. **REFERENCE**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987) Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990) Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989) „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, str. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication No 22, str. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974) „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), str. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981) „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965) „Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, str. 185-190.

(18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, str. 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988) „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, str. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976) „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, str. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967) „Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Food Agric., 18, str. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981) „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, str. 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977) „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, str. 961-971.

(25) Osgerby J.M., (1973) „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, str. 247-258.

(26) Guth J.A., (1972) „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, str. 143-154.

(27) Hamaker J.W., (1975) „The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), str. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971) „Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, str. 732-210.

(29) Hamaker J.W., (1972) „Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, str. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981) „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, str. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984) „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989) „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), str. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976) „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, str. 340-350.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980) „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, str. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990) „Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series No 2, str. 80-101,

(36) Lambert S.M., (1967) „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, str. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969) „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. J. Agri. Food Chem., 17, str. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969) „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. Nature, 223, str. 1288.

(39) Briggs G.G. (1981) „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. J. Agric. Food Chem., 29, str. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984) „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. J. Agric. Food Chem., 32, str. 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L., (1970) „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. Residue Rev., 32, str. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968) „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, str. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere 10, str. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989) „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, str. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972) „Adsorption in organic chemicals” in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, str. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971 „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19, str. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975) „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. Weed Science, Vol. 23, str. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, str. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980) „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982) 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc., 34, 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970) „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., str. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, str. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980) „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, str. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981) „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), str. 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983) „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), str. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984) „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), str. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), str. 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990) Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980) „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), str. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979) „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. Science, Vol. 206, str. 831-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981) „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, str. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), str. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité”. Revue de l'Agric., 34 (4), str. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996) „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), str. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995) „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), str. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), str. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, str. 29-36.

(78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970) „Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, str. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960) „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. J. Chem. Soc., str. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980) „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”. Ann. Agron. 31, str. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996) „Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

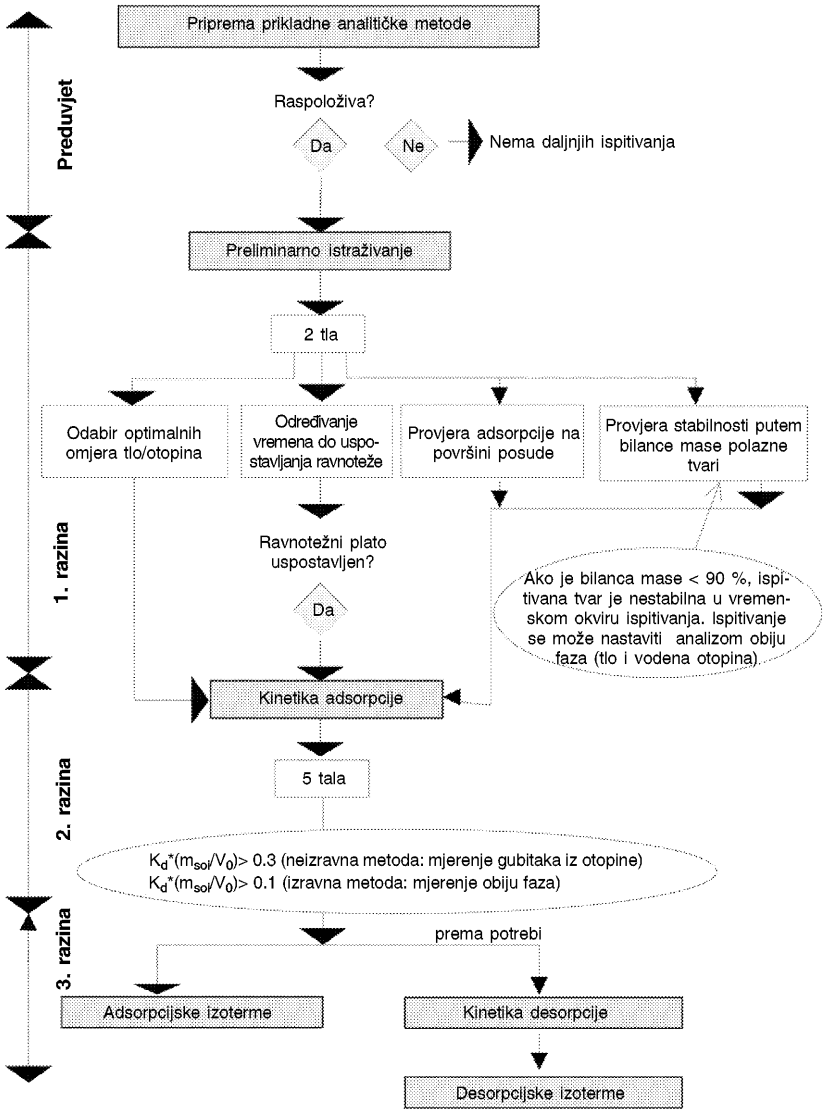
(84) Guth, J.A., (1985) „Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, str. 305 (1962).

▼B

Dodatak 1.

Plan ispitivanja



▼B

Dodatak 2.

UTJECAJ TOČNOSTI ANALITIČKE METODE I PROMJENE KONCENTRACIJE NA TOČNOST REZULTATA ADSORPCIJE

Iz tablice u nastavku (84) vidljivo je da u slučaju kad je razlika između početne mase (m_0 = 110 µg) i ravnotežne mase [$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg] ispitivane tvari u otopini vrlo mala, 5 %-tna greška u mjerenju ravnotežne koncentracije rezultira 50 %-tnom greškom u izračunu mase tvari adsorbirane u tlu [$m_s^{ads}(eq)$] i 52,4 %-tnom greškom u izračunu K_d.

Količina tla m_{soil} = 10 g

Volumen otopine V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	ZA A = 9 %							
m_0 = 110 µg ili C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	istinita vrijednost	10	1,00	istinita vrijednost	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	ZA A = 55 %							
m_0 = 110 µg ili C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	istinita vrijednost	60,0	6,00	istinita vrijednost	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	ZA A = 99 %							
m_0 = 110 µg ili C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	istinita vrijednost	108,9	10,89	istinita vrijednost	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{estimat}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{estimat}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = masa ispitivane tvari u fazi tla u ravnoteži, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa ispitivane tvari u vodenoj fazi u ravnoteži, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = sadržaj ispitivane tvari u fazi tla u ravnoteži, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = masena koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi u ravnoteži, µg cm^{-3}

R = analitička greška u određivanjum$_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = računska greška zbog analitičke greške R

▼B

Dodatak 3.

TEHNIKE PROCJENE ZA K_D

1. Tehnike procjene omogućuju predviđanje K_d na temelju korelacija npr. s vrijednostima P_{ow} (12)(39)(63-68), podacima o topljivosti u vodi (12)(19)(21)(39)(68-73), podacima o polaritetu dobivenim primjenom HPLC-a na obrnutu fazu (74-76). K_{oc} odnosno K_{om} izračunavaju se iz jednadžbi kako je prikazano u tablicama 1. i 2., a zatim posredno i K_d iz jednadžbi:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Koncept tih korelacija temelji se na dvije pretpostavke: (1) na adsorpciju tvari prvenstveno utječe organska tvar u tlu; i (2) interakcije koje pritom nastaju uglavnom su nepolarne prirode. Prema tomu, ove korelacije: (1) ne mogu se primijeniti ili se mogu samo djelomično primijeniti na polarne tvari i (2) nisu primjenljive u slučajevima kad je sadržaj organske tvari u tlu vrlo malen (12). Osim toga, iako su pronađene zadovoljavajuće korelacije između P_{ow} i adsorpcije (19), to ne vrijedi i za odnos između topljivosti u vodi i obima adsorpcije (19)(21); zasada su istraživanja vrlo kontradiktorna.

3. U tablicama 1. i 2. dani su neki primjeri korelacija između koeficijenta adsorpcije i podjelnog koeficijenta oktanol-voda te topljivosti u vodi.

Tablica 1.

Primjer korelacija između adsorpcijskog koeficijenta razdiobe i podjelnog koefiijenta oktanol-voda; za dodatne primjere vidjeti (12) (68).

Tvari	Korelacije	Autori
Supstituirane uree	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981.) (39)
Aromatske klorirane tvari	$\log K_{oc} = -0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou i sur. (1983.) (65)
Razni pesticidi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl i Mingelgrin (1984.) (66)
Aromatski ugljikovodici	$\log K_{oc} = -2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles i Mantoura (1987.) (67)

Tablica 2.

Primjeri korelacija između adsorpcijskog koeficijenta razdiobe i topljivosti u vodi; za dodatne primjere vidjeti (68) (69).

Spojevi	Korelacije	Autori
Razni pesticidi	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl i Mingelgrin (1984.) (66)
Alifatske, aromatske klorirane tvari	$\log K_{om} = (4{,}040 \pm 0{,}038) - (0{,}557 \pm 0{,}012) \log S_w$	Chiou i sur. (1979.) (70)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset i sur. (1981.) (71)
Cikličke, alifatske aromatske tvari	$\log K_{oc} = -1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953 (mp - 25)$	Karickhoff (1981.) (72)
Razni spojevi	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982.) (73)

▼B

Dodatak 4.

IZRAČUNI ZA DEFINIRANJE UVJETA CENTRIFUGIRANJA

1. Vrijeme centrifugiranja proizlazi iz sljedeće formule, uz pretpostavku sferičnih čestica:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{ap})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

U interesu jednostavnosti svi su parametri opisani u jedinicama različitim od SI jedinica (g, cm).

gdje je:

ω = brzina rotacije (= 2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = okretaji u minuti (o/min)

η = viskozitet otopine g s^{-1} cm^{-1}

r_p = polumjer čestica, cm

ρ_s = gustoća tla, g cm^{-3}

ρ_{aq} = gustoća otopine, g cm^{-3}

R_t = udaljenost od središta rotora centrifuge do vrha otopine u epruveti za centrifugiranje, cm

R_b = udaljenost od središta rotora centrifuge do dna epruvete za centrifugiranje, cm

R_b-R_t = dužina smjese tlo/otopina u epruveti za centrifugiranje, cm

U praksi se općenito primjenjuju dva puta duža vremena od izračunanih kako bi se zajamčilo potpuno odvajanje.

2. Jednadžba (1) može se dodatno pojednostavniti ako pretpostavimo da su viskozitet (η) i gustoća (ρ_{aq}) otopine jednaki viskozitetu i gustoći vode na 25 °C; prema tomu, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} i $\rho_{aq} = 1{,}0$ g. cm^{-3}.

Tada vrijeme centrifugiranja proizlazi iz jednadžbe (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Iz jednadžbe (2) vidljivo je da su za definiranje uvjeta centrifugiranja tj. vremena (t) i brzine (rpm tj. o/min), kako bi se postiglo odvajanje čestica određene veličine (u našem slučaju polumjera 0,1 μm), važna dva parametra: (1) gustoća tla i (2) dužina smjese u epruveti za centrifugiranje (R_b-R_t) tj. udaljenost koju čestica tla prelazi od vrha otopine do dna epruvete; očito je da u slučaju definiranog volumena dužina smjese u epruveti ovisi o kvadratu polumjera epruvete.

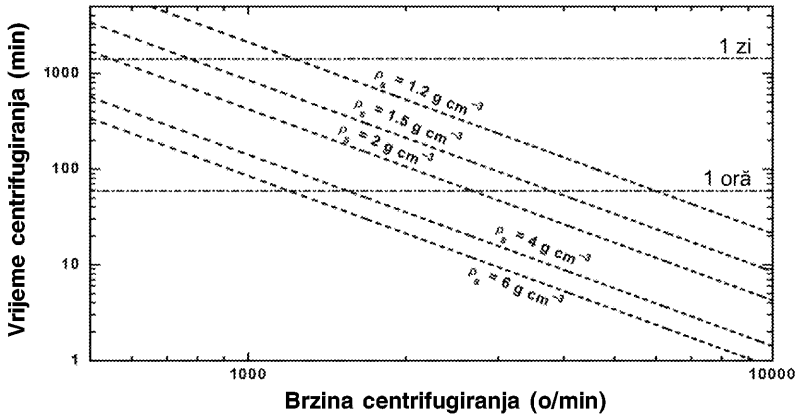
4. Na slici 1. prikazane su promjene vremena centrifugiranja (t) u ovisnosti o brzini centrifugiranja (rpm tj. o/min) za različite gustoće tla (ρ_s) (Slika 1.a) i različite dužine smjese u epruvetama za centrifugiranje (Slika 2.a). Iz slike 1.a jasno je vidljiv utjecaj gustoće tla; primjerice, kod klasičnog centrifugiranja na 3 000 o/min vrijeme centrifugiranja kod gustoće tla od 1,2 g cm^3 je približno 240 minuta, dok kod gustoće tla od 2,0 g cm^3 ono iznosi samo 50 minuta. Isto tako, iz slike 1.b vidljivo je da je kod klasičnog centrifugiranja na 3 000 o/min vrijeme centrifugiranja za dužinu smjese od 10 cm približno 50 minuta, dok za dužinu od 1 cm ono iznosi samo 7 minuta. Ipak, važno je pronaći optimalan odnos između centrifugiranja, koje zahtijeva što manju dužinu, i jednostavnosti rukovanja za izvođača pokusa prilikom odvajanja faza nakon centrifugiranja.

▼B

5. Povrh toga, kod definiranja pokusnih uvjeta za odvajanje faza tlo/otopina važno je uzeti u obzir moguću prisutnost treće „pseudo” faze tj. koloida. Ove čestice veličine ispod 0,2 μm mogu imati važan utjecaj na čitav mehanizam adsorpcije tvari u suspenziji tla. Kad se centrifugiranje provodi na način kako je gore opisano, koloidi ostaju u vodenoj fazi i analiziraju se zajedno s vodenom fazom. Time se gube informacije o njihovom utjecaju.

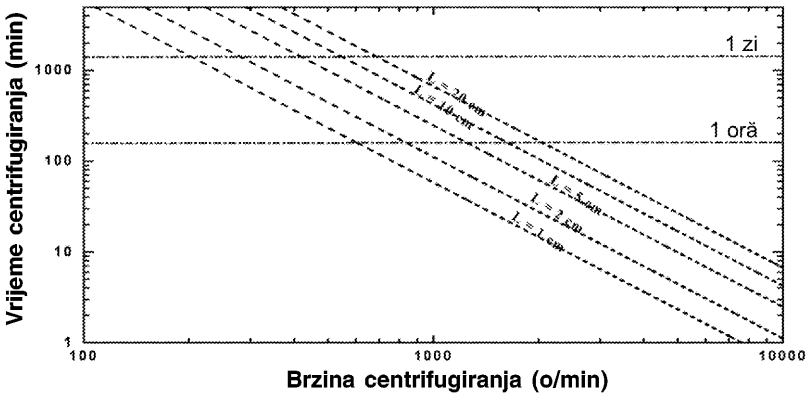
   Ako laboratorij ima opremu za ultracentrifugiranje ili ultrafiltraciju, adsorpcija/desorpcija tvari u tlu može se podrobnije ispitati, uključujući adsorpciju tvari na koloide. U tom slučaju treba primijeniti ultracentrifugiranje na 60 000 o/min/min ili ultrafiltraciju uz poroznost filtara od 100 000 daltona kako bi se odijelile sve tri faze: tlo, koloidi i otopina. Ispitni protokol treba u skladu s tim izmijeniti kako bi sve tri faze bile podvrgnute analizi tvari.

Slika 1.a



Promjene vremena centrifugiranja (t) u ovisnosti o brzini centrifugiranja (o/min) za različite gustoće tla (ρ_s). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} i ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3} na 25 °C.

Slika 1.b



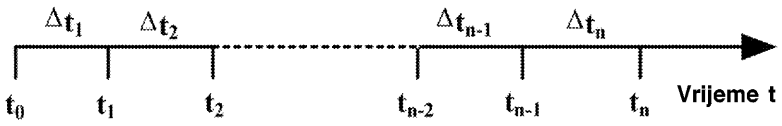
Promjene vremena centrifugiranja (t) u ovisnosti o brzini centrifugiranja (o/min) za različite dužine smjese u epruveti za centrifugiranje ($R_b - R_t$) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3} na 25 °C i ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Dodatak 5.

IZRAČUN ADSOPRCIJE A (%) I DESORPCIJE D (%)

Vremenska shema postupka je:



Kod svih se izračuna polazi od pretpostavke da je ispitivana tvar stabilna i da se ne adsorbira u značajnoj mjeri na stijenkama posude.

ADSORPCIJA A (A %)

(a) *Paralelna metoda*

Postotak adsorpcije izračunava se za svaku epruvetu (i) u svakom vremenu (t_i) prema sljedećoj jednadžbi:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (1)$$

Izrazi iz ove jednadžbe mogu se izračunati ovako:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0(\mu g) \qquad (3)$$

gdje je:

A_{t_i} = postotak adsorpcije (%) u vremenu t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa ispitivane tvari na tlu u vremenu t_i u kojemu se provodi analiza (μg)

m_0 = masa ispitivane tvari u epruveti na početku ispitivanja (μg)

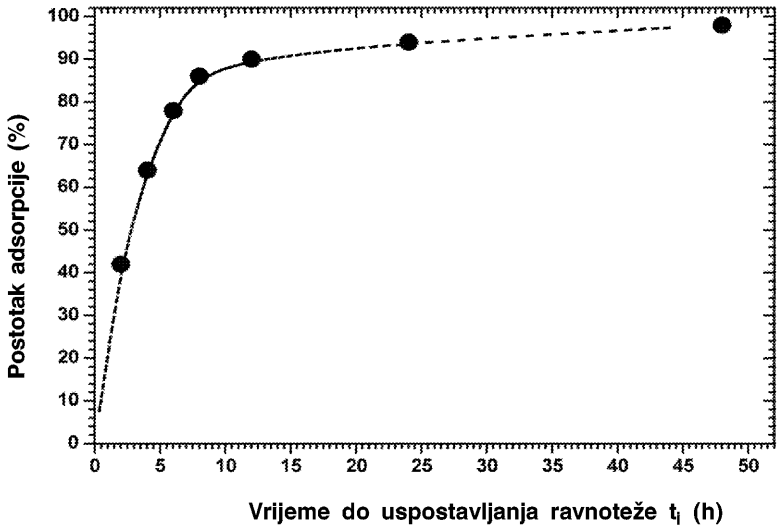
C_0 = početna masena koncentracija ispitne otopine u dodiru s tlom (μg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = masena koncentracija tvari u vodenoj fazi u vremenu t_i u kojemu se provodi analiza (μg cm^{-3}); ova se koncentracija određuje analitički, uzimajući u obzir vrijednosti slijepih proba

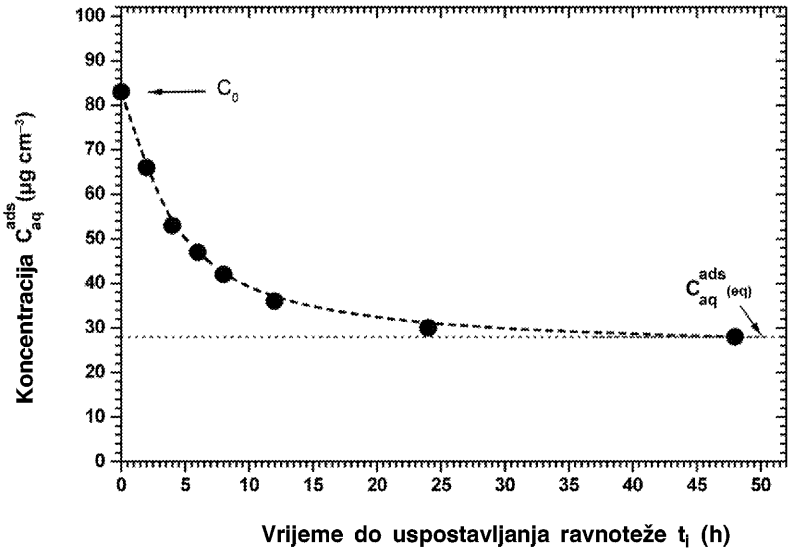
V_0 = početni volumen ispitne otopine u dodiru s tlom (cm^3)

Vrijednosti postotaka adsorpcije A_{ti} odnosno $C_{aq}^{ads}(t_i)$ prikažu se grafički u ovisnosti o vremenu i odredi vrijeme nakon kojega je postignuta sorpcijska ravnoteža. Primjeri takvih grafova prikazani se na slikama 1. i 2.



Slika 1.

Graf adsorpcijske ravnoteže



Slika 2.

Masena koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi (C_{aq}) u ovisnosti o vremenu

▼B

(b) *Serijska metoda*

Kod jednadžbi u nastavku uzeto je u obzir da se postupak ispitivanja adsorpcije provodi mjerenjima ispitivane tvari u malim alikvotima vodene faze u određenim vremenskim intervalima.

Količina tvari adsorbirana na tlo izračunava se u svakom vremenskom intervalu na sljedeći način:

— za prvi vremenski interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— za drugi vremenski interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— za treći vremenski interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— za n-ti vremenski interval $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

Postotak adsorpcije u svakom vremenskom intervalu $A_{\Delta t_i}$ izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

dok postotak adsorpcije (A_{t_i}) u vremenu t_i proizlazi iz sljedeće jednadžbe:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Vrijednosti asorpcije A_{t_i} odnosno $A_{\Delta t_i}$ (ovisno o potrebama istraživanja) prikažu se grafički u ovisnosti o vremenu i odredi se vrijeme nakon kojega je uspostavljena sorpcijska ravnoteža.

U ravnotežnom vremenu t_{eq}:

— masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo je:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— masa ispitivane tvari u otopini je:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— postotak adsorpcije u ravnoteži je:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Gornji parametri definirani su kao:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa tvari adsorbirana na tlo u vremenskim intervalima Δ_{t1}, Δ_{t2}, …, Δ_{tn} (μg)

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa tvari izmjerena u alikvotu $v_a{}^A$ u vremenu t_1, t_2, …., t_n (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = masa tvari adsorbirana na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa tvari u otopini u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

$v_a{}^A$ = volumen alikvota u kojemu se mjeri ispitivana tvar (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = postotak adsorpcije koji odgovara vremenskom intervalu Δ_{ti} (%)

A_{eq} = postotak adsorpcije u adsorpcijskoj ravnoteži (%)

DESORPCIJA D (A %)

Vremenom početka pokusa s kinetikom desorpcije (t_0) smatra se trenutak kad se maksimalni dobiveni volumen otopine ispitivane tvari (nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže) zamijeni jednakim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$.

(a) *Paralelna metoda*

U vremenu t_i izmjeri se masa ispitivane tvari u vodenoj fazi uzetoj iz epruvete i (V^i_r) i izračuna desorbirana masa prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

U desorpcijskoj ravnoteži $t_i = t_{eq}$ te je prema tomum$_{aq}^{des}(t_i)$m$_{aq}^{des}(eq)$

Masa ispitivane tvari desorbirana u vremenskom intervalu (Δt_i) proizlazi iz sljedeće jednadžbe:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Postotak desorpcije izračunava se:

u vremenu t_i pomoću jednadžbe:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

a u vremenskom intervalu (Δt_i) pomoću jednadžbe:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

gdje je:

D_{ti} = postotak desorpcije u vremenu t_i (%)

$D_{\Delta ti}$ = postotak desorpcije koji odgovara vremenskom intervalu Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masa ispitivane tvari desorbirana u vremenu t_i (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masa ispitivane tvari desorbirana u vremenskom intervalu Δt_i (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masa ispitivane tvari izmjerena analitički u vremenu t_i u volumenu otopine V_r^i koji se uzima na analizu (μg)

$m_{aq}{}^A$ = masa ispitivane tvari preostala nakon adsorpcijske ravnoteže zbog nepotpune zamjene volumena (μg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa ispitivane tvari u otopini u adsorpcijskoj ravnoteži (μg)

V_R = volumen supernatanta uklonjen iz epruvete nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže i zamijenjen istim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3)

V_r^i = volumen otopine uzet iz epruvete (i) u svrhu mjerenja ispitivane tvari u pokusu s kinetikom desorpcije (cm^3)

Vrijednosti desorpcije D_{ti} odnosno $D_{\Delta ti}$ (ovisno o potrebama istraživanja) prikažu se grafički u ovisnosti o vremenu i odredi vrijeme nakon kojega je postignuta desorpcijska ravnoteža.

(b) *Serijska metoda*

Kod jednadžbi u nastavku uzeto je u obzir da je prethodni postupak ispitivanja adsorpcije proveden mjerenjem ispitivane tvari u malim alikvotima (v_a^A) vodene faze (serijska metoda u odjeljku 1.9. „Provođenje ispitivanja”). Polazi se od pretpostavke da: (a) je volumen supernatanta uklonjen iz epruvete nakon pokusa s kinetikom adsorpcije zamijenjen istim volumenom otopine 0,01 M $CaCl_2$ (V_R) i (b) ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom (V_T) tijekom pokusa s kinetikom desorpcije ostaje nepromijenjen; on proizlazi iz sljedeće jednadžbe:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

U vremenu t_i:

— izmjeri se masa ispitivane tvari u malom alikvotu (v_a^D) i izračuna desorbirana masa prema jednadžbi:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - (i-1) \cdot v_a^D}{V_T}\right) \quad (19)$$

— u desorpcijskoj ravnoteži $t_i = t_{eq}$ te je prema tomu.$m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— postotak desorpcije D_{ti} izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

U vremenskom intervalu (Δt_i):

u svakom vremenskom intervalu izračuna se desorbirana količina tvari na sljedeći način:

— za prvi vremenski interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— za drugi vremenski interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) \quad (22)$$

i

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— za n-ti interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Na kraju se izračuna postotak desorpcije u svakom vremenskom intervalu $D_{\Delta ti}$ prema sljedećoj jednadžbi:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

dok postotak desorpcije D_{t_i} u vremenu t_i proizlazi iz sljedeće jednadžbe:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

gdje su gornji parametri definirani kao:

$m_s^{des}(\Delta t_1) m_s^{des}(\Delta t_2), \ldots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa tvari koja ostaje adsorbirana na tlu nakon vremenskih intervala Δt_1, Δt_2, …, Δt_n (μg)

$m^{des}{}_{aq}(\Delta t_1) m^{des}{}_{aq}(\Delta t_2), \ldots, m^{des}{}_{aq}(\Delta t_n)$ = masa ispitivane tvari desorbirana u vremenskim intervalima Δt_1, Δt_2, …, Δt_n (μg)

$m_s^{des}(t_1) m_s^{des}(t_2), \ldots, m_s^{des}(t_n)$ = masa tvari izmjerena u alikvotu (v_a^D) u vremenu t_1, t_2, …, t_n (μg)

V_T = ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom tijekom pokusa s kinetikom desorpcije izvedenog serijskom metodom (cm^3)

$m^A{}_{aq}$ = masa ispitivane tvari preostala nakon adsorpcijske ravnoteže zbog nepotpune zamjene volumena (μg)

$$m_{aq}^{A} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volumen supernatanta uklonjen iz epruvete nakon uspostave adsorpcijske ravnoteže i zamijenjen istom količinom otopine 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3)

v_a^D = volumen alikvota uzetog na analizu iz epruvete (i) tijekom pokusa s kinetikom desorpcije izvedenog serijskom metodom (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Dodatak 6.

ADSORPCIJA/DESORPCIJA U TLIMA: OBRASCI ZA DOSTAVU PODATAKA

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: .....°C

Prikladnost analitičke metode

Izvagana masa tla	g	
Tlo: suha masa	g	
Volumen otopine $CaCl_2$	cm^3	
Nazivna konc. konačne otopine	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analitička konc. konačne otopine	$\mu g\ cm^{-3}$	

Načelo analitičke metode:

Baždarenje analitičke metode:

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 sati): ..... %

Temperatura: ..... °C

Primijenjena analitička metodologija: Neizravna ☐ Paralelna ☐ Serijska ☐

Izravna ☐

Adsorpcijski test: ispitni uzorci

	Simbol	Jedinice	Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže	
Epruveta br.										
Izvagana masa tla	—	g								
Tlo: suha masa	m_{soil}	g								
Volumen vode u izvaganoj masi tla (izračunani)	V_{WS}	cm^3								
Volumen otopine 0,01 M $CaCl_2$ za ekvilibraciju tla		cm^3								
Volumen radne otopine		cm^3								
Ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom	V_0	cm^3								
Početna koncentracija ispitne otopine	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masa ispitivane tvari na početku ispitivanja	m_0	µg								

▼B

	Simbol	Jedinice	Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže		Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže	
Nakon tresenja i centrifugiranja										
NEIZRAVNA METODA										
Paralelna metoda										
Koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi, uklj. ispravak za vrijednost slijepe probe	$C_{ap}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Serijska metoda										
Izmjerena masa ispitivane tvari u alikvotuV_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
IZRAVNA METODA										
Masa ispitivane tvari adsorbirana na tlo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Izračun adsorpcije										
Adsorpcija	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Srednje vrijednosti										
Koeficijent adsorpcije	K_d	cm^3 g^{-1}								
Srednje vrijednosti										
Koeficijent adsorpcije	K_{co}	cm^3 g^{-1}								
Srednje vrijednosti										

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 sati): ..... %

Temperatura: ..... °C

Adsorpcijski test: slijepe probe i kontrola

	Simbol	Jedinice	Slijepa proba		Slijepa proba		Kontrola	
Epruveta br.								
Izvagana masa tla		g					0	0
Količina vode u izvaganoj masi tla (izračunana)		cm^3					—	—
Dodani volumen otopine 0,01 M $CaCl_2$		cm^3						
Dodani volumen radne otopine ispitivane tvari		cm^3	0	0				
Ukupni volumen vodene faze (izračunani)		cm^3					—	—

▼B

	Simbol	Jedinice	Slijepa proba		Slijepa proba		Kontrola	
Početna koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi		µg cm^{-3}						
Nakon tresenja i centrifugiranja								
Koncentracija u vodenoj fazi		µg cm^{-3}						

Napomena: prema potrebi dodati stupce

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 sati): ..... %

Temperatura: ..... °C

Bilanca mase

	Simbol	Jedinice				
Epruveta br.						
Izvagana masa tla	—	g				
Tlo: suha masa	ms_{oil}	g				
Volumen vode u izvaganoj masi tla (izračunani)	V_{WS}	ml				
Volumen otopine 0,01 M $CaCl_2$ za ekvilibraciju tla		ml				
Volumen radne otopine		cm^3				
Ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom	V_0	cm^3				
Početna koncentracija ispitne otopine	C_0	µg cm^{-3}				
Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže	—	h				
Nakon tresenja i centrifugiranja						
Koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi u adsorpcijskoj ravnoteži, uklj. ispravak za vrijednost slijepe probe	$C_{ap}^{ads}(ec)$	µg cm^{-3}				
Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže	t_{eq}	h				
1. razrjeđivanje otapalom						
Uklonjeni volumen vodene faze	V_{rec}	cm^3				
Dodani volumen otapala	ΔV	cm^3				
1. ekstrakcija otapalom						
Signal analiziran u otapalu	S_{E1}	var.				
Konc. ispitivane tvari u otapalu	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Simbol	Jedinice				
Masa tvari ekstrahirana iz tla i sa stijenki posude	m_{E1}	µg				

2. razrjeđivanje otapalom

Uklonjeni volumen otapala	ΔV_s	cm^3				
Dodani volumen otapala	$\Delta V'$	cm^3				

2. ekstrakcija otapalom

Signal analiziran u fazi otapala	S_{E2}	var.				
Konc. ispitivane tvari u otapalu	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masa tvari ekstrahirana iz tla i sa stijenki posude	m_{E2}	µg				
Ukupna masa ispitivane tvari ekstrahirana u dva koraka	m_E	µg				
Bilanca mase	MB	%				

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 sati): .....%

Temperatura: .....°C

Adsorpcijske izoterme

	Simbol	Jedinice								
Epruveta br.										
Izvagana masa tla	—	g								
Tlo: suha masa	E	g								
Volumen vode u izvaganoj masi tla (izračunani)	V_{WS}	cm^3								
Volumen otopine 0,01 M $CaCl_2$ za ekvilibraciju tla		cm^3								
Dodani volumen radne otopine		cm^3								
Ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom (izračunani)	V_0	cm^3								
Koncentracija otopine	C_0	µg cm^{-3}								
Vrijeme do uspostavljanja ravnoteže	—	h								

▼B

	Simbol	Jedinice								
Nakon tresenja i centrifugiranja										
Koncentracija tvari u vodenoj fazi, uklj. ispravak za vrijednost slijepe probe	$C_{ap}^{ads}(ec)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Adsorbirana masa po jedinici tla	$C_{s}^{ads}(ec)$	µg g^{-1}								

Regresijska analiza:

K_F^{ads} vrijednost:

vrijednost 1/n:

regresijski koeficijent r^2:

Ispitivana tvar:

Ispitivano tlo:

Sadržaj suhe mase tla (105 °C, 12 sati): ..... %

Temperatura: .....°C

Primijenjena analitička metodologija: Neizravna ☐ Paralelna ☐ Serijska ☐

Desorpcijski test

		Simbol	Jedinice	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval
Broj epruvete iz adsorpcijskog koraka							
Masa tvari adsorbirana na tlo u adsorpcijskoj ravnoteži		$m_{s}^{ads}(ec)$	µg				
Uklonjeni volumen vodene faze zamijenjen s 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Ukupni volumen vodene faze u dodiru s tlom	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masa ispitivane tvari preostala nakon adsorpcijske ravnoteže zbog nepotpune zamjene volumena		m_{ap}^{A}	µg				
Kinetika desorpcije							
Izmjerena masa tvari desorbirana iz tla u vremenu t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Volumen otopine uzet iz epruvete (i) u svrhu mjerenja ispitivane tvari	PM	V_r^{i}	cm^3				
	SM	V_a^{D}	cm^3				
Masa tvari desorbirana iz tla u vremenu t_i (izračunana)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masa tvari desorbirana iz tla u vremenskom intervalu Δt_i (izračunana)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbol	Jedinice	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval
Postotak desorpcije						
Desorpcija u vremenu t_i	D_{ti}	%				
Desorpcija u vremenskom intervalu Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Prividni koeficijent desorpcije	K_{des}					

PM: paralelna metoda

SM: serijska metoda

▼B

C.19. PROCJENA KOEFICIJENTA ADSORPCIJE (K_{oc}) NA TLO I KANALIZACIJSKI MULJ PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOLOGIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

1. METODA

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG121 (2001.).

1.1. UVOD

Sorpcijsko ponašanje tvari u tlu i kanalizacijskom mulju može se opisati parametrima koji se određuju pokusima u skladu s ispitnom metodom C.18. Važan parametar je koeficijent adsorpcije, koji se definira kao omjer koncentracije tvari u tlu/mulju i koncentracije tvari u vodenoj fazi u adsorpcijskoj ravnoteži. Koeficijent adsorpcije normiran na sadržaj organskog ugljika tla K_{oc} koristan je pokazatelj sposobnosti vezanja kemikalije na organsku tvar u tlu i kanalizacijskom mulju i omogućuje usporedbe između različitih kemikalija. Ovaj se parametar može procijeniti korelacijama s topljivošću u vodi i podjelnim koeficijentom n-oktanol/voda (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

HPLC se u pokusnoj metodi iz ovog testa koristi za procjenu koeficijenta adsorpcije K_{oc} u tlu i kanalizacijskom mulju (8). Procjene pokazuju veću pouzdanost od onih koje se dobiju izračunima QSAR (9). Kao metoda procjene on ne može u potpunosti zamijeniti šaržne pokuse u ravnoteži koji se koriste u ispitnoj metodi C.18. Ipak, procijenjeni K_{oc} može biti koristan za odabir ispitnih parametara za istraživanja adsorpcije/desorpcije u skladu s ispitnom metodom C.18. primjenom jednadžbe (3) za izračuavanje K_d (koeficijent razdiobe) ili K_f (Freundlichov koeficijent adsorpcije) (vidjeti odjeljak 1.2.).

1.2. DEFINICIJE

K_d: koeficijent razdiobe definiran je kao omjer ravnotežnih koncentracija C ispitivane tvari otopljene u dvofaznom sustavu koji se sastoji od sorbensa (tlo ili kanalizacijski mulj) i vodene faze; to je bezdimenzionalna vrijednost ako se koncentracije u obje faze izražavaju kao omjer masa/masa. Ako se koncentracija u vodenoj fazi izražava kao omjer masa/volumen, jedinice su ml· g^{-1}. K_d može biti različit ovisno o svojstvima sorbensa i može ovisiti o koncentraciji.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{ap}} \qquad (1)$$

gdje je:

C_{soil} = koncentracija ispitivane tvari u tlu u ravnoteži (µg· g^{-1})

C_{sludge} = koncentracija ispitivane tvari u mulju u ravnoteži (µg· g^{-1})

C_{aq} = koncentracija ispitivane tvari u vodenoj razi u ravnoteži (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}).

▼B

K_f: Freundlichov koeficijent adsorpcije definiran je kao koncentracija ispitivane tvari u tlu odnosno kanalizacijskom mulju (x/m) kad je ravnotežna koncentracija C_{aq} u vodenoj fazi jednaka jedan; jedinice su $\mu g \cdot g^{-1}$ sorbensa. Vrijednost se može razlikovati ovisno o svojstvima sorbensa.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n \cdot \log C_{ap}} \quad (2)$$

gdje je:

x/m = količina ispitivane tvari x (μg) adsorbirana na količinu sorbensa m (g) u ravnoteži

1/n = nagib Freundlichove adsorpcijske izoterme

C_{aq} = koncentracija ispitivane tvari u vodenoj fazi u ravnoteži (μg· ml- ^{1})

$AtC_{ap} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc}: koeficijent razdiobe (K_d) ili Freundlichov koeficijent adsorpcije (K_f) normiran na sadržaj organskog ugljika (f_{oc}) sorbensa; on je, posebno kod neioniziranih kemikalija, približni pokazatelj obima adsorpcije između tvari i sorbensa i omogućuje usporedbe između različitih kemikalija. Ovisno o dimenzijama K_d i K_f, K_{oc} može biti bezdimenzionalan ili se izražavati u jedinicama ml· g^{-1} ili μg· g^{-1} organske tvari.

$$K_{co} = \frac{Kd}{fco}\ (\text{bezdimenzionalni ili ml} \cdot g^{-1}) \text{ili} \frac{Kf}{fco}\ (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Odnos između K_{oc} i K_d nije uvijek linearan, tako da se vrijednosti K_{oc} mogu razlikovati ovisno o vrsti tla, ali je njihova varijabilnost znatno smanjena u odnosu na vrijednosti K_d i K_f.

Koeficijent adsorpcije (K_{oc}) izvodi se iz faktora kapaciteta (k') uz pomoć baždarnoga grafa log k' u ovisnosti o log K_{oc} odabranih referentnih spojeva.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

gdje je:

t_R = vrijeme zadržavanja ispitivane i referentne tvari iz HPLC-a (minute)

t_0 = mrtvo vrijeme HPLC-a (minute) (vidjeti odjeljak 1.8.2.)

P_{ow}: Podjelni koeficijent oktanol-voda definiran je kao omjer koncentracija tvari otopljene u n-oktanolu i vodi; to je bezdimenzionalna vrijednost.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Cap}\ (= Kow) \quad (5)$$

1.3. REFERENTNE TVARI

Prije primjene metode treba biti poznata strukturna formula, čistoća i konstanta disocijacije (prema potrebi). Također su korisne informacije o topljivosti u vodi i organskim otapalima, podjelnom koeficijentu oktanol-voda i hidrolitičkim svojstvima.

▼B

Za uspostavu korelacije između izmjerenih podataka o zadržavanju ispitivane tvari iz HPLC-a i njezinog koeficijenta adsorpcije K_{oc} treba izraditi baždarni graf log K_{oc} u ovisnosti o log k'. Potrebno je najmanje šest referentnih točaka, od čega najmanje jedna iznad i jedna ispod očekivane vrijednosti za ispitivanu tvar. Točnost metode se značajno poboljšava ako su referentne tvari strukturno srodne s ispitivanom tvari. Ako ti podaci nisu raspoloživi, korisnik sam treba odabrati odgovarajuće baždarne tvari. U tom slučaju treba odabrati općenitiji skup strukturno heterogenih tvari. Tvari i vrijednosti K_{oc} koje se mogu koristiti navedene su u Dodatku, i to u tablici 1. za kanalizacijski mulj i u tablici 3. za tlo. Ako se koriste druge baždarne tvari, treba navesti obrazloženje.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

HPLC se provodi na analitičkim kolonama koje su napunjene komercijalno dostupnom krutom fazom cijanopropila koja sadrži lipofilne i polarne dijelove. Koristi se umjereno polarna nepokretna faza sa silika matricom:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silika	nepolarna razmaknica	polarni dio

Načelo ispitne metode slično je kao kod ispitne metode A.8. (podjelni koeficijent, metoda HPLC). Dok ispitivana tvar prolazi kroz kolonu s pokretnom fazom dolazi do interakcije između ispitivane tvari i nepokretne faze. Uslijed podjele između pokretne i nepokretne faze ispitivana tvar zaostaje. Dvojni sastav nepokretne faze, s polarnim i nepolarnim mjestima, omogućuje interakciju polarnih i nepolarnih skupina molekule na sličan način kao što je to slučaj kod organske tvari u matricama tla ili kanalizacijskog mulja. To omogućuje utvrđivanje odnosa između vremena zadržavanja na koloni i koeficijenta adsorpcije na organsku tvar.

pH ima značajan utjecaj na sorpcijsko ponašanje, posebno kod polarnih tvari. Kod poljoprivrednih tala i spremnika postrojenja za pročišćivanje otpadnih voda pH se obično kreće između 5,5 i 7,5. Kod ionizirajućih tvari treba provesti dva ispitivanja, s ioniziranim i neioniziranim oblikom u odgovarajućim puferskim otopinama, ali samo u slučajevima kad najmanje 10 % ispitivanog spoja disocira u području pH 5,5 do 7,5.

Budući da se za ocjenjivanje koristi samo odnos između zadržavanja na koloni HPLC i koeficijenta adsorpcije, nije potrebna kvantitativna analitička metoda, već samo treba odrediti vrijeme zadržavanja. Ako je raspoloživ prikladan skup referentnih tvari i ako se mogu primijeniti standardni pokusni uvjeti, ova metoda omogućuje brzu i učinkovitu procjenu koeficijenta adsorpcije K_{oc}.

1.5. PRIMJENLJIVOST TESTA

Metoda HPLC može se primijeniti na kemikalije (neobilježene i obilježene) za koje je raspoloživ odgovarajući detekcijski sustav (npr. spektrofotometar, detektor radioaktivnosti) i koje su dovoljno stabilne u vremenu trajanja pokusa. Ona posebno može biti korisna u slučaju kemikalija koje se teško ispituju u drugim pokusnim sustavima (tj. hlapljive tvari, tvari koje nisu topljive u vodi u koncentraciji koja se može analitički mjeriti, tvari s visokim afinitetom prema površini inkubacijskih sustava). Metoda se može koristiti u slučaju smjesa koje daju nerazlučljive eluacijske pikove. U tom slučaju treba navesti gornje i donje granice vrijednosti log K_{oc} spojeva ispitne smjese.

▼B

Nečistoće ponekad mogu stvarati poteškoće kod tumačenja rezultata HPLC-a, ali one nisu posebno značajne dok god se ispitivana tvar može analitički jasno identificirati i odijeliti od nečistoća.

Ova je metoda validirana za tvari iz tablice 1. u Dodatku, a korištena je i kod raznih drugih kemikalija iz sljedećih razreda kemikalija:

— aromatski amini (npr. trifluralin, 4-kloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin, 1-naftilamin),

— aromatski esteri karboksilne kiseline (npr. metilni ester benzojeve kiseline, etilni ester 3,5-dinitrobenzojeve kiseline),

— aromatski ugljikovodici (npr. toluen, ksilen, etilbenzen, nitrobenzen),

— esteri ariloksifenoksipropionske kiseline (npr. diklofop-metil, fenoksaprop-etil, fenoksaprop-P-etil),

— fungicidi iz skupine benzimidazola i imidazola (npr. karbendazim, fuberidazol, triazoksid),

— amidi karboksilne kiseline (npr. 2-klorobenzamid, N,N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— klorirani ugljikovodici (npr. endosulfan, DDT, heksaklorbenzen, kvintozen, 1,2,3-triklorbenzen),

— organofosforni insekticidi (npr. azinfos-metil, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos),

— fenoli (npr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorfenol, 2,4,6-triklorfenol, 1-naftol),

— derivati feniluree (npr. izoproturon, monolinuron, pencikuron),

— pigmentna bojila (npr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— poliaromatski ugljikovodici (npr. acenaftalen, naftalen),

— 1,3,5-triazinski herbicidi (npr. prometrin, propazin, simazin, terbutrin),

— derivati triazola (npr. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoda se ne može primijeniti kod tvari koje reagiraju s eluentom ili nepokretnom fazom. Osim toga, nije primjenljiva niti na tvari kod kojih se javljaju specifične interakcije s anorganskim komponentama (npr. stvaranje „klaster” kompleksa s mineralima glina). Ona se također može pokazati nedjelotvornom kod površinski aktivnih tvari, anorganskih spojeva i umjerenih ili jakih organskih kiselina i baza. Mogu se odrediti vrijednosti log K_{oc} u području od 1,5 do 5,0. Ionizirajuće se tvari moraju mjeriti pomoću puferirane pokretne faze, ali treba paziti da ne dođe do taloženja puferskih komponenti i ispitivane tvari.

▼B

1.6. KRITERIJI KAKVOĆE

1.6.1. **Točnost**

Koeficijent adsorpcije ispitivane tvari se u pravilu može procijeniti u granicama +/- 0,5 log jedinica vrijednosti određene metodom šaržnog ispitivanja u ravnoteži (vidjeti tablicu 1. u Dodatku). Veća se točnost može postići korištenjem referentnih tvari koje su strukturno srodne s ispitivanom tvari.

1.6.2. **Ponovljivost**

Potrebna su barem dvostruka određivanja. Vrijednosti log K_{oc} izvedene iz pojedinih mjerenja moraju se kretati unutar područja od 0,25 log jedinica.

1.6.3. **Obnovljivost**

Dosadašnja iskustva s primjenom metode podupiru njezinu valjanost. Ispitivanjem metode HPLC uz primjenu 48 tvari (većinom pesticidi) za koje su bili raspoloživi pouzdani podaci o K_{oc} na tlo dobiven je koeficijent korelacije R = 0,95 (10)(11).

U svrhu poboljšanja i validacije metode provedeno je međulaboratorijsko poredbeno ispitivanje u kojemu je sudjelovalo 11 laboratorija (12). Rezultati su navedeni u tablici 2. u Dodatku.

1.7. OPIS ISPITNE METODE

1.7.1. **Preliminarna procjena koeficijenta adsorpcije**

Podjelni koeficijent oktanol-voda P_{ow} (= K_{ow}) i, u određenoj mjeri, topljivost u vodi mogu poslužiti kao pokazatelji obima adsorpcije, posebno kod neioniziranih tvari, te se stoga mogu koristiti za preliminarno određivanje raspona. Objavljene su različite korisne korelacije za nekoliko skupina kemikalija (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2. **Aparatura**

Potreban je tekućinski kromatograf opremljen bespulsnom pumpom i prikladnim detektorom. Preporučuje se korištenje ventila za ubrizgavanje s injekcijskom petljom. Treba koristiti komercijalne kemijski vezane cijanopropilne smole na bazi silike (npr. Hypersil i Zorbax CN). Između sustava za ubrizgavanje i analitičke kolone može se postaviti predkolona od istog materijala. Kolone različitih dobavljača mogu se značajno razlikovati prema učinkovitosti odvajanja. Za orijentaciju, kad se kao pokretna faza koristi metanol/voda 55/45 %, treba postići sljedeće faktore kapaciteta k': log k' > 0,0 za log K_{oc} = 3,0 i log k' > — 0,4 za log K_{oc} = 2,0.

1.7.3. **Pokretne faze**

Ispitano je više pokretnih faza, a preporučuju se ove dvije:

— metanol/voda (55/45 % v/v),

— metanol/0,01 M citratni pufer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Za pripremu eluacijskog otapala koristi se metanol kromatografske čistoće (HPLC) i destilirana voda ili citratni pufer. Smjesa se prije uporabe otplini. Treba primijeniti izokratičku eluaciju. Ako smjese metanol/voda nisu prikladne, mogu se iskušati druge smjese organsko otapalo/voda, npr. etanol/voda ili acetonitril/voda. Kod ionizirajućih se tvari preporučuje korištenje puferske otopine za stabilizaciju pH. Treba paziti da ne dođe do taloženja soli i propadanja kolone, što se može dogoditi kod nekih smjesa organska faza/pufer.

Ne smiju se koristi dodaci kao što su reagensi s ionskim parovima jer oni mogu utjecati na sorpcijska svojstva nepokretne faze. Takve promjene nepokretne faze mogu biti ireverzibilne. Stoga se pokusi u kojima se koriste dodaci moraju obvezatno provoditi na zasebnim kolonama.

1.7.4. **Otopljene tvari**

Ispitivane i referentne tvari treba otopiti u pokretnoj fazi.

1.8. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.8.1. **Ispitni uvjeti**

Tijekom mjerenja treba bilježiti temperaturu. Preporučuje se korištenje uređaja s termostatiranom dijelom za kolone kako bi se zajamčili stalni uvjeti za vrijeme baždarenja, procjena i mjerenja ispitivane tvari.

1.8.2. **Određivanje mrtvog vremena t_o**

Za određivanje mrtvog vremena t_o mogu se koristiti dvije različite metode (vidjeti i odjeljak 1.2.).

1.8.2.1. *Određivanje mrtvog vremena t_o putem homolognog niza*

Pokazalo se da ovaj postupak daje pouzdane i standardizirane vrijednosti t_o. Za detalje vidjeti ispitnu metodu A.8.: Podjelni koeficijent (n-oktanol/voda), metoda HPLC.

1.8.2.2. *Određivanje mrtvog vremena pomoću inertnih tvari koje kolona ne zadržava*

Ova se tehnika temelji na ubrizgavanju otopina formamida, uree ili natrijevog nitrata. Potrebna su barem dvostruka mjerenja.

1.8.3. **Određivanje vremena zadržavanja tR**

Referentne tvari treba odabrati na način kako je opisano u odjeljku 1.3. One se za potrebe određivanja vremena zadržavanja mogu ubrizgati kao miješani standard, ako je potvrđeno da na vrijeme zadržavanja pojedinačnih referentnih standarda ne utječe prisutnost drugih referentnih standarda. Baždarenje treba provoditi najmanje dvaput dnevno u redovitim razmacima, kako bi se mogle objasniti neočekivane promjene u radu kolone. Baždarna ubrizgavanja je najbolje provoditi prije i nakon ubrizgavanja ispitivane tvari, kako bi se isključili pomaci u vremenu zadržavanja. Ispitivane se tvari ubrizgaju odvojeno u što manjim količinama (kako bi se izbjeglo preopterećenje kolone) te se odrede njihova vremena zadržavanja.

▼B

Da bi se povećala pouzdanost mjerenja, treba provoditi barem dvostruka određivanja. Vrijednosti log K_{oc} izvedene iz pojedinih mjerenja moraju se kretati unutar područja od 0,25 log jedinica.

1.8.4. **Ocjenjivanje**

Faktori kapaciteta k' izračunavaju se iz mrtvog vremena t_o i vremena zadržavanja t_R odabranih referentnih tvari pomoću jednadžbe 4 (vidjeti odjeljak 1.2.). Zatim se podaci log k' referentnih tvari prikažu grafički u odnosu prema vrijednostima log K_{oc} iz šaržnih pokusa u ravnoteži, koje su navedene u tablici 1. i 3. u Dodatku. Nakon toga se uz pomoć dobivenoga grafa vrijednost log K_{oc} određuje iz vrijednosti log k' ispitivane tvari. Ako stvarni rezultati pokazuju da se log K_{oc} ispitivane tvari nalazi izvan baždarnog područja, ispitivanje treba ponoviti koristeći druge, primjerenije referentne tvari.

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

— identitet i čistoću ispitivanih i referentnih tvari te, prema potrebi, vrijednosti pK_a,

— opis opreme i radnih uvjeta, npr. tip i dimenzije analitičke kolone (i predkolone), detekcijsko sredstvo, pokretnu fazu (omjer komponenti i pH), temperaturno područje tijekom mjerenja,

— mrtvo vrijeme i metodu pomoću koje je određeno,

— količine ispitivanih i referentnih tvari uvedene u kolonu,

— vremena zadržavanja referentnih spojeva koji su korišteni za baždarenje,

— podatke o prilagođenom regresijskom pravcu (log k'/log K_{oc}) i graf regresijskog pravca,

— prosječne podatke o zadržavanju i procijenjenu vrijednost d log K_{oc} za ispitivani spoj,

— kromatograme.

3. **REFERENCE**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed), (1990) Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams, (1988) The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, str. 167.

(3) G.G. Briggs, (1981) Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, str. 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding, (1983) Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, str. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984) Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, str. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed, (1979) A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, str. 831-832.

(7) S.W. Karickhoff, (1981) Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, str. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann, (1997) Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), str. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996) Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), str. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), str. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991) Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, str. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), str. 1373-1384.

▼B

Dodatak

Tablica 1.

Usporedba vrijednosti K_{oc} za tla i kanalizacijske muljeve i vrijednosti izračunanih pomoću orijentacijske („screening”) metode HPLC [1] [2]

tvar	CAS br.	log K_{oc} kanalizacijski muljevi	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} tla	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenilester benzojeve kiseline	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

[1] W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann, (1997) Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), str. 121-128.
[2] W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke, (1997) Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), str. 107-119.

Tablica 2.

Rezultati međulaboratorijskog poredbenog ispitivanja (uz sudjelovanje 11 laboratorija) provedenog u svrhu poboljšanja i validacije metode HPLC [1]

tvar	CAS br.	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[metoda HPLC]	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

[1] W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tablica 3.

Preporučene referentne tvari za orijentacijsku („screening”) metodu HPLC na temelju podataka o adsorpciji na tlo

Referentna tvar	CAS br.	srednje vrijednosti log K_{oc} iz šaržnog ispitivanja u ravnoteži	broj podataka K_{oc}	log S.D.	izvor
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N.N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metilbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Izoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoksid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-triklorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metil	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (smjesa)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein., (1991) Chemosphere, 22, str. 285-304.
[c] Podaci iz industrije.

▼M7

C.20. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA VRSTI *DAPHNIA MAGNA*

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 211 (2012.). Smjernice OECD-a za ispitivanje periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Smjernica za ispitivanje reproduktivne toksičnosti 211 razvijena je iz Smjernice za ispitivanje 202 dijela II., Ispitivanje reproduktivne toksičnosti na rodu *Daphnia* sp. (1984.). Bilo je opće priznato da podaci iz ispitivanja provedenih u skladu sa Smjernicom za ispitivanje 202 mogu varirati. Zbog toga su uloženi znatni napori u utvrđivanje razloga te varijabilnosti s ciljem izrade bolje ispitne metode. Smjernica za ispitivanje 211 temelji se na ishodu tih aktivnosti istraživanja, međulaboratorijskih ispitivanja i validacijskih istraživanja provedenih 1992. (1.), 1994. (2.) i 2008. (3.).

Glavne su razlike između početne verzije (Smjernica za ispitivanje 202, 1984.) i druge verzije (Smjernica za ispitivanje 211, 1998.) Smjernice za ispitivanje reproduktivne toksičnosti sljedeće:

— za uporabu se preporučuje vrsta *Daphnia magna*,

— ispitivanje traje 21 dan,

— u polustatičkim ispitivanjima broj životinja koje treba upotrijebiti pri svakoj ispitnoj koncentraciji smanjen je s najmanje 40, po mogućnosti podijeljenih u četiri skupine od po deset životinja, na najmanje deset životinja koje se drže pojedinačno (iako se za protočna ispitivanja mogu primjenjivati i drukčiji planovi),

— dane su detaljnije preporuke za ispitni medij i uvjete hranjenja.

— glavne su razlike između druge verzije Smjernice za ispitivanje reproduktivne toksičnosti (TG 211, 1998.) i ove verzije sljedeće:

— dodan je Dodatak 7. u kojem su opisani postupci za utvrđivanje spola novorođenih životinja ako je to potrebno. U skladu s prijašnjim verzijama ove ispitne metode, omjer životinja prema spolu fakultativna je krajnja točka,

— varijabla odgovora broj živih potomaka po preživjeloj roditeljskoj životinji dopunjena je dodatnom varijablom odgovora za reprodukciju dafnija, a to je ukupni broj živih potomaka na kraju ispitivanja po roditeljskoj dafniji na početku ispitivanja, isključujući pritom iz analize slučajnu i/ili nenamjernu smrtnost roditeljskih životinja. Cilj je dodane varijable odgovora usklađivanje te varijable odgovora s drugim metodama ispitivanja reproduktivne toksičnosti na beskralježnjacima. Nadalje, u vezi s tom varijablom odgovora moguće je u ovoj ispitnoj metodi ukloniti izvor pogreške, odnosno učinak nenamjerne i/ili slučajne smrtnosti roditeljskih životinja ako do toga dođe tijekom razdoblja izlaganja,

— dodatne statističke smjernice za plan ispitivanja i obradu rezultata uključene su u pristup ECx (npr. EC10 ili EC50) i pristup NOEC-a/LOEC-a,

— uvedeno je granično ispitivanje.

Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

Primarni je cilj ovog ispitivanja ocijeniti učinak kemikalija na reproduktivnu uspješnost vrste *Daphnia magna*. S tim se ciljem mlade ženke dafnije (roditeljske životinje), koje su na početku ispitivanja mlađe od 24 sata, izlažu ispitivanoj kemikaliji dodanoj u vodu u određenom rasponu koncentracija. Ispitivanje traje 21 dan. Na kraju ispitivanja ocjenjuje se ukupni broj živih potomaka. Reproduktivna uspješnost roditeljskih životinja može se i drukčije izraziti (npr. kao broj živih potomaka po životinji i danu od prvog dana kad je zapaženo potomstvo), ali to bi trebalo dokumentirati dodatno uz ukupni broj živih potomaka na kraju ispitivanja. Zbog posebnog plana polustatičkog ispitivanja u usporedbi s drugim metodama ispitivanja reproduktivne toksičnosti na beskralježnjacima, moguće je

▼M7

prebrojati i broj živih potomaka po svakoj pojedinačnoj roditeljskoj životinji. Time se, za razliku od drugih metoda ispitivanja reproduktivne toksičnosti na beskralježnjacima, omogućuje da se iz ocjenjivanja podataka isključe potomci roditeljske životinje koja je slučajno i/ili nenamjerno uginula tijekom razdoblja ispitivanja. Stoga, ako se u izloženim ponovljenim uzorcima pojavi smrtnost roditeljskih životinja, trebalo bi razmotriti je li smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju ili nije, npr. postoji li značajna regresija odgovora u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije s pozitivnim nagibom (za tu se namjenu može primijeniti statističko ispitivanje kao što je Cochran-Armitageov test trenda). Ako smrtnost nije povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, ponovljene bi uzorke u kojima se javila smrtnost roditeljskih životinja trebalo isključiti iz analize rezultata ispitivanja. Ako je smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, smrtnost roditeljskih životinja trebalo bi utvrditi kao učinak ispitivane kemikalije i ponovljene uzorke ne bi trebalo isključiti iz analize. Ako roditeljska životinja ugine tijekom ispitivanja, npr. slučajno zbog nepravilnog postupanja ili nezgode ili nenamjerno zbog neobjašnjenog uzroka koji nije povezan s učinkom ispitivane kemikalije ili ako se utvrdi da je mužjak, ponovljeni se uzorak isključuje iz analize (za više pojedinosti vidjeti stavak 51.). Toksični učinak ispitivane kemikalije na reproduktivnu uspješnost izražava se kao ECx uvrštavanjem podataka u prikladan model nelinearnom regresijom kako bi se ocijenila koncentracija koja bi prouzročila x %-tno smanjenje reproduktivne uspješnosti ili, alternativno, kao vrijednost NOEC-a/LOEC-a (4.). *Ispitne koncentracije trebale bi obuhvaćati najnižu upotrijebljenu koncentraciju s učinkom (npr. EC_{10}), što znači da se ta vrijednost izračunava interpolacijom, a ne ekstrapolacijom.*

Trebalo bi dokumentirati i preživljavanje roditeljskih životinja te vrijeme do pojave prvog legla. Mogu se ispitivati i drugi učinci na parametre povezani s kemikalijom, kao što je rast (npr. dužina) i, možda, intrinzična stopa prirasta populacije (vidjeti stavak 44.).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti (vidjeti poglavlje C.2. ovog Priloga: Ispitivanje akutne imobilizacije *Daphnia* sp.) provedenog na vrsti *Daphnia magna* mogu biti korisni za odabir prikladnog raspona ispitnih koncentracija u ispitivanjima reproduktivne toksičnosti. Topljivost u vodi i tlak pare ispitivane kemikalije trebali bi biti poznati te bi trebalo staviti na raspolaganje pouzdanu analitičku metodu za kvantifikaciju kemikalije u ispitnim otopinama s dokumentiranom učinkovitošću izdvajanja i granicom utvrđivanja.

Informacije o ispitivanoj kemikaliji koje mogu biti korisne za uspostavljanje uvjeta ispitivanja uključuju strukturnu formulu, čistoću kemikalije, stabilnost na svjetlosti, stabilnost u uvjetima ispitivanja, pKa, P_{ow} i rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (vidjeti poglavlja C.4. (utvrđivanje „lake” biorazgradivosti) i C.29. (laka biorazgradivost – CO_2 u začepljenim posudama) ovog Priloga).

VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, kontrole bi trebale zadovoljiti sljedeće kriterije uspješnosti:

— smrtnost roditeljskih životinja (ženki dafnija) na kraju ispitivanja nije veća od 20 %,

— srednji broj živih potomaka po roditeljskoj životinji koja je živa na kraju ispitivanja je ≥ 60.

Napomena: jednaki kriterij valjanosti (20 %) može se primjenjivati za slučajnu i nenamjernu smrtnost roditeljskih životinja za kontrole i za svaku ispitnu koncentraciju.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

Ispitne posude i druga oprema koja dolazi u dodir s ispitnim otopinama trebale bi biti u cijelosti izrađene od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Ispitne posude uobičajeno su staklene laboratorijske čaše.

Osim toga, potrebni su neki ili svi dijelovi opreme u nastavku:

— mjerač kisika (s mikroelektrodom ili drugom prikladnom opremom za mjerenje otopljenog kisika u uzorcima malog volumena),

— odgovarajući uređaj za regulaciju temperature,

— mjerač pH-vrijednosti,

— oprema za utvrđivanje tvrdoće vode,

— oprema za utvrđivanje koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC) u vodi ili oprema za utvrđivanje kemijske potrošnje kisika (KPK),

— odgovarajući uređaji za regulaciju režima rasvjete i mjerenje intenziteta svjetlosti.

Ispitni organizmi

U ispitivanju se upotrebljava vrsta *Daphnia magna* Straus ([1]).

Po mogućnosti, klon bi trebalo utvrditi genotipizacijom. Istraživanjima (1.) se pokazalo da se reproduktivnom uspješnošću klona A (koji je potekao od IRCHA-a u Francuskoj) (5.) redovito zadovoljava kriterij valjanosti kojim se propisuje srednja izmjerena vrijednost $\geq$ 60 živih potomaka po preživjeloj roditeljskoj životinji ako se uzgaja u uvjetima opisanima u ovoj ispitnoj metodi. Međutim, prihvatljivi su i drugi klonovi ako se dokaže da se kulturom dafnija zadovoljavaju kriteriji valjanosti ispitivanja.

Na početku ispitivanja životinje bi trebale biti mlađe od 24 sata i ne bi trebale biti potomstvo iz prvog legla. Dafnije bi trebale potjecati iz zdrave matične populacije (tj. na njima ne bi trebali biti vidljivi znakovi stresa, kao što su visoka smrtnost, prisutnost mužjaka i efipija, zakašnjelo davanje prvog legla, životinje promijenjene boje itd.). Matične životinje trebalo bi držati u uvjetima uzgoja kulture (svjetlost, temperatura, medij, hranjenje i broj životinja po jedinici volumena) koji su slični uvjetima ispitivanja. Ako se u ispitivanju upotrebljava medij za uzgoj kultura dafnija koji se razlikuje od medija upotrijebljenog za rutinske kulture dafnija, dobrom se praksom smatra uključivanje razdoblja aklimatizacije prije ispitivanja, uobičajeno od približno tri tjedna (tj. jedna generacija), kako roditeljske životinje ne bi bile izložene stresu.

Ispitni medij

Preporučuje se da se u ovom ispitivanja upotrebljava potpuno definirani medij. Time se može izbjeći uporaba dodataka (npr. morske trave, ekstrakta tla itd.), koje je teško opisati, i tako poboljšati prilike za standardizaciju među laboratorijima. Pokazalo se da su za to prikladni mediji Elendt M4 (6.) i M7 (vidjeti Dodatak 2.). Međutim, prihvatljivi su i drugi mediji (npr. 7. i 8.) pod uvjetom da se dokaže da su svojstva kulture dafnija u skladu s kriterijima valjanosti ispitivanja.

([1]) Mogu se upotrebljavati i druge vrste dafnija pod uvjetom da su ispunjeni odgovarajući kriteriji valjanosti (kriterij valjanosti koji se odnosi na reproduktivnu uspješnost u kontrolama trebao bi biti relevantan za *sve* vrste). Ako se upotrebljavaju druge dafnije, one bi trebale biti jasno utvrđene, a njihova bi uporaba trebala biti opravdana.

▼M7

Ako se primjenjuju mediji koji sadržavaju nedefinirane dodatke, te dodatke trebalo bi jasno specificirati i u izvješću o ispitivanju trebalo bi navesti informacije o sastavu, posebno s obzirom na sadržaj ugljika jer to može utjecati na prehranu. Preporučuje se da se utvrde ukupni organski ugljik (TOC) i/ili kemijska potrošnja kisika (KPK) radnog pripravka organskog dodatka i ocijeni doprinos TOC-u/KPK-u u ispitnom mediju. Nadalje, preporučuje se da razine TOC-a u mediju (odnosno prije dodavanja algi) budu ispod 2 mg/l (9.).

Kada se ispituju kemikalije koje sadržavaju metale, važno je imati na umu da svojstva ispitnog medija (npr. tvrdoća, sposobnost kelatiranja) mogu utjecati na toksičnost ispitivane kemikalije. Iz tog je razloga poželjno upotrebljavati potpuno definirani medij. Međutim, Elendt M4 i M7 trenutačno su jedini poznati potpuno definirani mediji koji su prikladni za dugoročni uzgoj kulture vrste *Daphnia magna*. Oba medija sadržavaju kelatni agens EDTA. Radovima se pokazalo (2.) da je„prividna toksičnost" kadmija općenito niža kada se ispitivanje reproduktivne toksičnosti provodi u medijima M4 i M7 nego u medijima koji ne sadržavaju EDTA. Stoga se M4 i M7 ne preporučuju za ispitivanje kemikalija koje sadržavaju metale, a trebalo bi izbjegavati i druge medije koji sadržavaju poznate kelatne agense. Za kemikalije koje sadržavaju metale može biti preporučljivo upotrijebiti alternativni medij, kao što je, na primjer, obrađena tvrda slatka voda prema ASTM-u (9.) koja ne sadržava EDTA. Ta kombinacija obrađene tvrde slatke vode prema ASTM-u i ekstrakta morske trave (10.) prikladna je za dugoročan uzgoj kulture vrste *Daphnia magna* (2.).

Koncentracija otopljenog kisika trebala bi biti veća od 3 mg/l na početku i tijekom ispitivanja. pH-vrijednost trebala bi biti u rasponu od 6 do 9 i uobičajeno ne bi trebala varirati za više od 1,5 jedinica u okviru pojedinačnog ispitivanja. Preporučuje se tvrdoća iznad 140 mg/l (kao $CaCO_3$). Ispitivanjima pri tim i višim razinama dokazana je reproduktivna uspješnost u skladu s kriterijima valjanosti (11. i 12.).

Ispitne otopine

Ispitne otopine u odabranim koncentracijama uobičajeno se pripremaju razrjeđivanjem matične otopine. Po mogućnosti, matične otopine trebalo bi, bez primjene bilo kakvih otapala ili dispergenata ako je to moguće, pripremiti miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u ispitnom mediju mehaničkim sredstvima, kao što su mućkalica, mješač ili ultrazvuk, ili drugim prikladnim metodama. Po mogućnosti, sustave ispitivanja trebalo bi prije uvođenja ispitnih organizama izložiti koncentracijama ispitivane kemikalije koja će se upotrebljavati u istraživanju toliko dugo koliko je potrebno da se dokaže održavanje stabilnih koncentracija pri izlaganju. Ako se ispitivana kemikalija teško otapa u vodi, trebalo bi slijediti postupke opisane u Smjernici OECD-a za rukovanje teškim tvarima (13.). Trebalo bi izbjegavati uporabu otapala ili dispergenata, ali ona je u nekim slučajevima možda potrebna kako bi se dobila prikladno koncentrirana matična otopina za primjenu doze.

Uz ispitne koncentracije trebalo bi provesti jednu kontrolu s vodom za razrjeđivanje s prikladnim ponovljenim uzorcima i, ako je to neizbježno, jednu kontrolu s otapalom s prikladnim ponovljenim uzorcima. U ispitivanju bi trebalo upotrebljavati samo otapala ili dispergente za koje je istraživanjem utvrđeno da nemaju nikakve značajne učinke ili da imaju samo minimalne učinke na varijablu odgovora. Primjeri prikladnih otapala (kao što su aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilen glikol) i dispergenata (kao što su Cremophor RH40, metilceluloza 0,01 % i HCO-40) navedeni su u (13.). Ako se primjenjuje otapalo ili

▼M7

dispergent, njegova konačna koncentracija ne bi trebala biti veća od 0,1 ml/l (13.) i u svim bi se ispitnim posudama trebala upotrebljavati jednaka koncentracija, osim u kontroli s vodom za razrjeđivanje. Međutim, trebalo bi uložiti sve napore da se održi minimalna koncentracija otapala.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Trajanje

Ispitivanje traje 21 dan.

Punjenje

Roditeljske životinje drže se pojedinačno, po jedna u svakoj ispitnoj posudi, uobičajeno s 50 – 100 ml medija (za vrstu *Daphnia magna* mogući su manji volumeni, posebno za manje dafnije, kao što je npr. *Ceriodaphnia dubia*) u svakoj posudi, osim ako je za ispitivanje neophodan plan protočnog ispitivanja.

Ponekad mogu biti potrebni i veći volumeni kako bi se ispunili zahtjevi analitičkog postupka koji se primjenjuje za utvrđivanje koncentracije ispitivane kemikalije, iako je za kemijsku analizu dopušteno i objedinjavanje ponovljenih uzoraka. Ako se upotrebljavaju volumeni iznad 100 ml, može biti potrebno povećati količinu hrane koja se daje dafnijama kako bi se osigurala prikladna raspoloživost hrane i usklađenost s kriterijima valjanosti.

Pokusne životinje

U polustatičkim ispitivanjima trebalo bi pojedinačno držati najmanje deset životinja pri svakoj ispitnoj koncentraciji i još najmanje deset životinja pojedinačno u kontrolnim nizovima.

Pokazalo se da je u protočnim ispitivanjima prikladno upotrijebiti 40 životinja podijeljenih u četiri skupine od po deset životinja pri svakoj ispitnoj koncentraciji (1.). Može se upotrijebiti i manji broj ispitnih organizama, a preporučuje se najmanje 20 životinja po koncentraciji podijeljenih u dva ili više ponovljenih uzoraka s jednakim brojem životinja (npr. četiri ponovljena uzorka s po pet dafnija). Treba napomenuti da u ispitivanjima u kojima se životinje drže u skupinama neće biti moguće isključiti nijednog potomka iz statističke analize ako dođe do pojave nenamjerne/slučajne smrtnosti roditeljskih životinja nakon što je reprodukcija započela te bi stoga u tim slučajevima reproduktivnu uspješnost trebalo izraziti kao ukupni broj živih potomaka po roditeljskoj životinji prisutnoj na početku ispitivanja.

Ispitnim posudama trebalo bi dodijeliti tretiranja, a svako naknadno postupanje s ispitnim posudama trebalo bi se temeljiti na slučajnom odabiru. U protivnom se može javiti pristranost koja bi se mogla tumačiti kao učinak koncentracije. Konkretno, ako se pokusnim jedinicama rukuje redoslijedom tretiranja ili koncentracije, određeni učinci povezani s vremenom, kao što su zamor ispitivača ili neka druga pogreška, mogu za posljedicu imati veće učinke pri višim koncentracijama. Nadalje, ako bi na rezultate ispitivanja mogao utjecati neki početni uvjet ili uvjet okoline ispitivanja, kao što je položaj u laboratoriju, trebalo bi razmisliti o formiranju blokova ispitivanja.

Hranjenje

Po mogućnosti, u polustatičkim ispitivanjima hranjenje bi trebalo obavljati svakodnevno, a najmanje tri puta tjedno (tj. u skladu s promjenama medija). Moguće razrjeđivanje koncentracija pri izlaganju dodavanjem hrane trebalo bi uzeti u obzir i izbjegavati što je to više moguće dobro koncentriranim suspenzijama algi. Svako odstupanje (npr. u protočnim ispitivanjima) trebalo bi dokumentirati.

Po mogućnosti, prehrana roditeljskih životinja tijekom ispitivanja trebala bi se sastojati od živih stanica algi jedne od ili više sljedećih vrsta: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (prije *Selenastrum capricornutum*) i *Desmodesmus subspicatus* (prije *Scenedesmus subspicatus*). Prehranu bi trebalo temeljiti na količini organskog ugljika (C) koja se osigurava svakoj roditeljskoj životinji. Istraživanjima (14.) se pokazalo da su za vrstu *Daphnia magna* količine

▼M7

hrane između 0,1 i 0,2 mg C/dafnija/dan dovoljne da se postigne broj živih potomaka potreban za ispunjavanje kriterija valjanosti ispitivanja. Količina hrane može biti ujednačena tijekom čitavog razdoblja ispitivanja ili se, po želji, na početku može davati manja količina hrane koja se zatim povećava tijekom ispitivanja, uzimajući pritom u obzir rast roditeljskih životinja. Ipak, i u tom slučaju količina hrane trebala bi u svakom trenutku biti unutar preporučenog raspona od 0,1 do 0,2 mg C/dafnija/dan.

Ako se za utvrđivanje potrebne količine hrane primjenjuju zamjenske mjere, kao što su broj stanica algi ili apsorpcija svjetlosti (iz praktičnih razloga jer je za mjerenje sadržaja ugljika potrebno dosta vremena), svaki laboratorij trebao bi izraditi vlastiti nomogram odnosa zamjenske mjere i sadržaja ugljika u kulturi algi (za savjet o izradi nomograma vidjeti Dodatak 3.). Nomograme bi trebalo provjeravati najmanje jednom godišnje, a češće ako je došlo do promjene uvjeta u uzgoju kulture algi. Pokazalo se da je apsorpcija svjetlosti bolja zamjena za sadržaj ugljika od broja stanica (15.).

Dafnije bi trebalo hraniti koncentriranom suspenzijom algi kako bi volumen medija za uzgoj kulture algi koji se prenosi u ispitne posude bio što manji. Koncentracija algi može se postići centrifugiranjem i resuspendiranjem u mediju za uzgoj kulture dafnija.

Svjetlo

16-satno osvjetljenje intenziteta do najviše 15 – 20μE · m^{-2} · s^{-1} mjereno na površini vode u posudi. Kod instrumenata za mjerenje intenziteta svjetlosti kalibriranih u luksima raspon od 1 000 do 1 500 luksa za hladno bijelo svjetlo približno odgovara preporučenom intenzitetu svjetlosti od 15 do 20 μE · m^{-2} · s^{-1}.

Temperatura

Temperatura ispitnog medija trebala bi biti u rasponu od 18 do 22 °C. Međutim, promjene temperature tijekom pojedinačnog ispitivanja ne bi trebale biti veće, ako je to moguće, od 2 °C unutar tih granica (npr. 18 – 20, 19 – 21 ili 20 – 22 °C). Može biti prikladno upotrijebiti dodatnu ispitnu posudu za praćenje temperature.

Dozračivanje

Ispitne posude ne bi se trebale dozračivati tijekom ispitivanja.

Plan ispitivanja

Test za utvrđivanje raspona

Ako je to potrebno, provodi se test za utvrđivanje raspona s, na primjer, pet koncentracija ispitivane kemikalije i dva ponovljena uzorka za svako tretiranje i svaku kontrolu. Dodatne informacije, iz ispitivanja sa sličnim kemikalijama ili iz literature, o akutnoj toksičnosti za dafnije i/ili druge vodene organizme mogu jednako tako biti korisne pri odlučivanju o rasponu koncentracija koje će se upotrebljavati pri testiranju za utvrđivanje raspona.

Test za utvrđivanje raspona traje 21 dan ili dovoljno dugo za pouzdano predviđanje razina učinka. Na kraju testa ocjenjuje se reprodukcija dafnija. Trebalo bi zabilježiti broj roditeljskih životinja i pojavu potomaka.

Glavno ispitivanje

Uobičajeno bi trebalo biti najmanje pet ispitnih koncentracija kojima je obuhvaćena efektivna koncentracija (npr. EC_x) i koje su raspoređene u geometrijskom nizu i po mogućnosti se ne bi trebale razlikovati za faktor veći od 3,2. Za svaku ispitnu koncentraciju trebalo bi upotrijebiti prikladan broj ponovljenih uzoraka

▼M7

(vidjeti stavke 24. i 25.). Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, trebalo bi navesti obrazloženje. Kemikalije se ne bi trebale ispitivati iznad granice topljivosti u ispitnom mediju. Preporučuje se prije provedbe pokusa razmotriti statističku snagu plana ispitivanja i primjenu prikladnih statističkih metoda (4.). Pri utvrđivanju raspona koncentracija trebalo bi voditi računa o sljedećem:

i. ako se ocjenjuje EC_x u pogledu učinaka na reprodukciju, preporučuje se uporaba dovoljnih koncentracija kako bi se utvrdio EC_x s prikladnom razinom pouzdanosti. Po mogućnosti, upotrijebljenim ispitnim koncentracijama trebalo bi obuhvatiti procijenjeni EC_x koji je dobiven interpolacijom, a ne ekstrapolacijom. Prednost je ako statistička analiza koja slijedi ima više ispitnih koncentracija (npr. deset) i manje ponovljenih uzoraka za svaku koncentraciju (npr. pet, čime se zadržava stalan ukupni broj posuda) s deset kontrola;

ii. pri ocjenjivanju LOEC-a i/ili NOEC-a najniža ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno niska da reproduktivna uspješnost pri toj koncentraciji nije znatno manja od reproduktivne uspješnosti u kontroli. Ako to nije slučaj, ispitivanje bi se trebalo ponoviti sa sniženom najnižom koncentracijom;

iii. pri ocjenjivanju LOEC-a i/ili NOEC-a najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da je reproduktivna uspješnost pri toj koncentraciji znatno manja od reproduktivne uspješnosti u kontroli. Ako to nije slučaj, ispitivanje bi trebalo ponoviti s povećanom najvišom koncentracijom, osim ako je u početnom ispitivanju kao najviša ispitna koncentracija bila upotrijebljena maksimalna predviđena ispitna koncentracija za ispitivanje kroničnih učinaka (odnosno 10 mg/l).

Ako u testu za utvrđivanju raspona nisu zapaženi nikakvi učinci pri najvišoj koncentraciji (npr. pri 10 mg/l) ili ako je vrlo vjerojatno da ispitivana kemikalija izaziva nisku toksičnost / ne izaziva toksičnost na temelju izostanka toksičnosti za druge organizme i/ili male apsorpcije / izostanka apsorpcije, ispitivanje reproduktivne toksičnosti može se provesti kao granično ispitivanje uz primjenu ispitne koncentracije od npr. 10 mg/l i kontrole. Za tretiranu i kontrolnu skupinu trebalo bi upotrijebiti po deset ponovljenih uzoraka. Ako je možda potrebno provesti granično ispitivanje u protočnom sustavu, prikladan bi bio manji broj ponovljenih uzoraka. Graničnim ispitivanjem osigurat će se mogućnost dokazivanja da ne postoji statistički značajan učinak pri graničnoj koncentraciji, ali ako su zabilježeni učinci, uobičajeno će biti potrebno potpuno ispitivanje.

Kontrole

Uz ispitni niz trebalo bi provesti jedan kontrolni niz s ispitnim medijem i, ako je to potrebno, jedan kontrolni niz koji sadržava otapalo ili dispergent. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, njegova koncentracija trebala bi biti jednaka kao u posudama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju. Trebalo bi upotrijebiti prikladan broj ponovljenih uzoraka (vidjeti stavke 23. i 24.).

Općenito, u dobro provedenom ispitivanju koeficijent varijacije oko srednje vrijednosti broja živih potomaka po roditeljskoj životinji u kontrolama trebao bi biti $\leq$ 25 % i to bi trebalo dokumentirati za planove ispitivanja u kojima se upotrebljavaju životinje koje se drže pojedinačno.

Obnavljanje ispitnog medija

Učestalost obnavljanja medija ovisit će o stabilnosti ispitivane kemikalije, ali bi medij trebalo obnoviti najmanje tri puta tjedno. Ako se preliminarnim ispitivanjima stabilnosti (vidjeti stavak 7.) pokazalo da koncentracija ispitivane kemikalije nije stabilna (odnosno da je izvan raspona od 80 do 120 % nazivne koncentracije ili da je ispod 80 % izmjerene početne koncentracije) u maksimalnom razdoblju obnavljanja (tj. tri dana), trebalo bi razmotriti češće obnavljanje medija ili primjenu protočnog ispitivanja.

▼M7

Kada se medij obnavlja u polustatičkim ispitivanjima, priprema se drugi niz ispitnih posuda u koje se prenose roditeljske životinje, na primjer staklenom pipetom prikladnog promjera. Volumen medija koji se prenosi s dafnijama trebao bi biti što je moguće manji.

Zapažanja

Rezultate zapažanja tijekom ispitivanja trebalo bi zabilježiti u obrasce za dostavu podataka (vidjeti primjere u dodacima 4. i 5.). Ako su potrebna druga mjerenja (vidjeti stavak 44.), možda će biti potrebna dodatna zapažanja.

Potomstvo

Po mogućnosti, potomke svake roditeljske životinje trebalo bi ukloniti i prebrojiti svakog dana od pojave prvog legla kako ne bi potrošili hranu namijenjenu roditeljskoj životinji. Za potrebe ove ispitne metode, prebrojavanjem treba utvrditi samo broj živih potomaka, ali trebalo bi zabilježiti i prisutnost propalih jajašaca ili mrtvih potomaka.

Smrtnost

Po mogućnosti, smrtnost roditeljskih životinja trebalo bi bilježiti svakodnevno, a najmanje u vrijeme prebrojavanja potomstva.

Ostali parametri

Iako je ova ispitna metoda u načelu namijenjena ocjenjivanju učinaka na reproduktivnu uspješnost, moguće je i da se drugi učinci mogu u dovoljnoj mjeri kvantificirati za statističku analizu. Može se bilježiti reproduktivna uspješnost po preživjeloj roditeljskoj životinji, odnosno broj živih potomaka tijekom ispitivanja po preživjeloj roditeljskoj životinji. To se može usporediti s glavnom varijablom odgovora (reproduktivnom uspješnošću po roditeljskoj životinji na početku ispitivanja koja nije nenamjerno ili slučajno uginula tijekom ispitivanja). Ako se pojavi smrtnost roditeljskih životinja u izloženim ponovljenim uzorcima, trebalo bi razmotriti je li smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju ili nije, npr. postoji li značajna regresija odgovora u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije s pozitivnim nagibom (za tu se namjenu može primijeniti statističko ispitivanje kao što je Cochran-Armitageov test trenda). Ako smrtnost nije povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, ponovljene bi uzorke u kojima se javila smrtnost roditeljskih životinja trebalo isključiti iz analize rezultata ispitivanja. Ako je smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, smrtnost roditeljskih životinja trebalo bi pripisati učinku ispitivane kemikalije i ponovljene uzorke ne bi trebalo isključiti iz analize rezultata ispitivanja. Mjerenja rasta vrlo su poželjna jer se na temelju njih dobivaju informacije o mogućim subletalnim učincima koja mogu biti korisna uz sama mjerenja reprodukcije; preporučuje se da se na kraju ispitivanja izmjeri dužina roditeljskih životinja (odnosno dužina tijela bez analne bodlje). Ostali parametri koji se mogu mjeriti ili izračunati uključuju vrijeme do pojave prvog legla (i naknadnih legla), broj i veličinu legla po životinji, broj propalih legla, prisutnost novorođenih mužjaka (OECD, 2008.) ili efipija i možda intrinzičnu stopu prirasta populacije (vidjeti Dodatak 1. za definiciju i Dodatak 7. za utvrđivanje spola novorođenih životinja).

Učestalost analitičkih utvrđivanja i mjerenja

Koncentraciju kisika, temperaturu, tvrdoću i pH-vrijednosti trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno u svježem i starom mediju, u kontrolama i u najvišoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u redovitim intervalima tijekom ispitivanja.

U polustatičkim ispitivanjima u kojima se očekuje da će koncentracija ispitivane kemikalije ostati u granicama ±20 % nazivne koncentracije (odnosno u rasponu od 80 do 120 %, vidjeti stavke 6., 7. i 39.) preporučuje se da se u prvom tjednu

▼M7

ispitivanja analiziraju najmanje najviša i najniža ispitna koncentracija odmah nakon pripreme i jednom u vrijeme obnavljanja (tj. analize bi trebalo provesti na uzorku iz iste otopine odmah nakon pripreme i pri obnavljanju). Ta bi utvrđivanja zatim trebalo ponavljati najmanje u tjednim intervalima.

U ispitivanjima u kojima se ne očekuje da će koncentracija ispitivane kemikalije ostati u granicama ±20 % nazivne koncentracije potrebno je analizirati sve ispitne koncentracije odmah nakon pripreme i pri obnavljanju. Međutim, u ispitivanjima u kojima izmjerena početna koncentracija ispitivane kemikalije nije u granicama ±20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (odnosno da su unutar raspona od 80 do 120 % početnih koncentracija), kemijska utvrđivanja mogu se u drugom i trećem tjednu ispitivanja ograničiti na najvišu i najnižu ispitnu koncentraciju. U svakom slučaju, utvrđivanje koncentracija ispitivane kemikalije prije obnavljanja treba provesti samo na jednoj posudi s ponovljenim uzorkom pri svakoj ispitnoj koncentraciji.

Ako se primjenjuje protočno ispitivanje, prikladan je režim uzorkovanja sličan opisanom za polustatička ispitivanja (ali u tom slučaju nije primjenjivo mjerenje „starih” otopina). Međutim, može biti uputno povećati broj uzorkovanja u prvom tjednu (npr. tri seta mjerenja) kako bi se osigurala stabilnost ispitnih koncentracija. U takvim vrstama ispitivanja trebalo bi svakodnevno provjeravati brzinu protoka razrjeđivača i ispitivane kemikalije.

Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane kemikalije cijelo vrijeme ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako je odstupanje od nazivne ili izmjerene početne koncentracije veće od ± 20 %, rezultate bi trebalo izraziti kao vremenski ponderiranu srednju vrijednost (vidjeti smjernice za izračun u Dodatku 6.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

Svrha je ovog ispitivanja utvrditi učinke ispitivane kemikalije na reproduktivnu uspješnost. Ukupni broj živih potomaka po roditeljskoj životinji trebalo bi izračunati za svaku ispitnu posudu (odnosno ponovljeni uzorak). Osim toga, reprodukcija se može izračunati na temelju davanja živih potomaka preživjelih roditeljskih organizama. Međutim, ekološki najrelevantnija varijabla odgovora ukupni je broj živih potomaka po roditeljskoj životinji koja ne ugine slučajno ([1]) ili nenamjerno ([2]) tijekom ispitivanja. Ako roditeljska životinja slučajno ili nenamjerno ugine tijekom ispitivanja ili ako se ispostavi da je riječ o mužjaku, ponovljeni se uzorak isključuje iz analize. U tom se slučaju analiza temelji na smanjenom broju ponovljenih uzoraka. Ako se pojavi smrtnost roditeljskih životinja u izloženim ponovljenim uzorcima, trebalo bi razmotriti je li smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju ili nije, npr. postoji li značajna regresija odgovora u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije s pozitivnim nagibom (za tu se namjenu može primijeniti statističko ispitivanje kao što je Cochran-Armitageov test trenda). Ako smrtnost nije povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, ponovljene bi uzorke u kojima se javila smrtnost roditeljskih životinja trebalo isključiti iz analize rezultata ispitivanja. Ako je smrtnost povezana s obrascem odgovora na koncentraciju, smrtnost roditeljskih životinja trebalo bi utvrditi kao učinak ispitivane kemikalije i ponovljene uzorke ne bi trebalo isključiti iz analize rezultata ispitivanja.

Ukratko, kada se za izražavanja učinaka upotrebljavaju LOEC i NOEC ili EC_x, preporučuje se izračunati učinak na reprodukciju primjenom obiju prethodno navedenih varijabli odgovora, odnosno

([1]) Slučajna smrtnost: smrtnost koja nije povezana s kemikalijom i koja je uzrokovana slučajnim događajem (odnosno uzrok je poznat).

([2]) Nenamjerna smrtnost: smrtnost koja nije povezana s kemikalijom i kojoj nije poznat uzrok.

▼M7

— kao ukupni broj živih potomaka po roditeljskoj životinji koja ne ugine slučajno ili nenamjerno tijekom ispitivanja i

— kao broj živih potomaka po preživjeloj roditeljskoj životinji,

i zatim kao konačni rezultat upotrijebiti najnižu vrijednost NOEC-a i LOEC-a ili EC_x izračunatu primjenom bilo koje od tih dviju varijabli odgovora.

Prije primjene statističke analize, npr. postupaka analize varijance (ANOVA), usporedbe tretiranja i kontrole Studentovim t-testom, Dunnettovim testom, Williamsovim testom ili postupnim Jonckheere-Terpstraovim testom, preporučuje se razmotriti pretvorbu podataka ako je to potrebno za ispunjavanje zahtjeva određenog statističkog ispitivanja. Kao neparametrijske alternative mogu se razmotriti Dunnov test ili Mann-Whitneyjev test. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunavaju se za pojedinačne srednje izmjerene vrijednosti tretiranja.

Broj preživjelih roditeljskih životinja u netretiranim kontrolama kriterij je valjanosti i trebalo bi ga zabilježiti i dokumentirati. Jednako tako, u završnom izvješću trebalo bi dokumentirati sve ostale štetne učinke, npr. neuobičajeno ponašanje i toksikološki značajne nalaze.

ECx

Vrijednosti ECx, uključujući s njima povezane donje i gornje granice pouzdanosti, izračunavaju se prikladnim statističkim metodama (npr. logističkom ili Weibullovom funkcijom, modificiranom Spearman-Karberovom metodom ili jednostavnom interpolacijom). Za izračun EC10, EC_{50} ili bilo koje drugog ECx trebalo bi cjelokupan skup podataka podvrgnuti regresijskoj analizi.

NOEC/LOEC

Ako je cilj statističke analize utvrditi NOEC/LOEC, trebalo bi primijeniti prikladne statističke metode u skladu s Dokumentom OECD-a 54 o postojećim pristupima statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (4.). Općenito, štetni učinci ispitivane kemikalije u usporedbi s kontrolom istražuju se primjenom jednosmjernog ispitivanja hipoteze pri $p \leq 0,05$.

Uobičajena razdioba i homogenost varijance mogu se ispitati primjenom prikladnog statističkog ispitivanja, npr. Shapiro-Wilkovog ispitivanja i Leveneovog ispitivanja ($p \leq 0,05$). Mogu se provesti jednosmjerna ANOVA i naknadna višestruka usporedna ispitivanja. Višestruke usporedbe (npr. Dunnettov test) ili postupni testovi trenda (npr. Williamsov test ili postupni Jonckheere-Terpstraov test) mogu se upotrebljavati kako bi se izračunalo postoje li značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrola i različitih koncentracija ispitivane kemikalije (odabir preporučenog testa u skladu sa Smjernicom OECD-a 54 (4.)). U protivnom, za utvrđivanje NOEC-a i LOEC-a mogle bi se primjenjivati neparametrijske metode (npr. Bonferronijevo-U-ispitivanje u skladu s Holmovim ili Jonckheere-Terpstraovim testom trenda).

Granično ispitivanje

Ako je provedeno granično ispitivanje (usporedba kontrole i samo jednog tretiranja) i ako su ispunjeni preduvjeti postupaka parametrijskog ispitivanja (normalnost, homogenost), metrički odgovori mogu se ocijeniti Studentovim testom (t-testom). Ako ti uvjeti nisu ispunjeni, mogu se primjenjivati t-test nejednake varijance (kao što je Welchov test) ili neki neparametrijski test, kao što je Mann-Whitheyjev-U-test.

Za utvrđivanje značajnih razlika između kontrola (kontrola i kontrola s otapalom ili dispergentom) mogu se ispitati ponovljeni uzorci za svaku kontrolu kako je opisano za granično ispitivanje. Ako se tim ispitivanjima ne otkriju značajne razlike, svi se kontrolni ponovljeni uzorci i kontrolni ponovljeni uzorci s otapalom mogu objediniti. U protivnom, sva tretiranja trebalo bi usporediti s kontrolom s otapalom.

▼M7

Izvješće o ispitivanju

Izvješće o ispitivanju uključuje sljedeće.

Ispitivana kemikalija:

— fizičko stanje i relevantna fizičko-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući čistoću.

Ispitne vrste:

— klon (bez obzira na to je li genetski tipiziran ili nije), dobavljač odnosno izvor (ako su poznati) i uvjeti uzgoja kulture. Ako se upotrebljava vrsta različita od vrste *Daphnia magna*, to bi trebalo dokumentirati i obrazložiti.

Ispitni uvjeti:

— primijenjeni postupak ispitivanja (npr. polustatički ili protočni, volumen, količina punjenja kao broj dafnija po litri),

— fotoperiod i intenzitet svjetlosti,

— plan ispitivanja (npr. broj ponovljenih uzoraka, broj roditeljskih životinja po ponovljenom uzorku),

— pojedinosti o mediju za uzgoj kulture,

— dodaci organskog materijala ako se upotrebljavaju, uključujući sastav, izvor, način pripreme, TOC/KPK radnih pripravaka, procjenu TOC-a/KPK-a u ispitnom mediju,

— detaljne informacije o hranjenju, uključujući količinu (u mg C/dafnija/dan) i raspored (npr. vrsta hrane, u slučaju algi i specifični naziv (vrsta) te, ako je poznato, subpopulacija, uvjeti uzgoja kulture),

— način pripreme matičnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom).

Rezultati:

— rezultati svih preliminarnih istraživanja stabilnosti ispitivane kemikalije,

— nazivne ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za utvrđivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama (vidjeti primjer obrazaca za dostavu podataka u Dodatku 5.), trebalo bi dokumentirati i učinkovitost izdvajanja za metodu te granicu utvrđivanja,

— kakvoća vode u ispitnim posudama (odnosno pH-vrijednost, temperatura i koncentracija otopljenog kisika, TOC i/ili KPK i tvrdoća ako je to primjenjivo) (vidjeti primjer obrasca za dostavu podataka u Dodatku 4.),

— potpuna evidencija o davanju živih potomaka tijekom ispitivanja za svaku roditeljsku životinju (vidjeti primjer obrasca za dostavu podataka u Dodatku 4.),

— broj uginulih roditeljskih životinja i dan kada je smrt nastupila (vidjeti primjer obrasca za dostavu podataka u Dodatku 4.),

— koeficijent varijacije za kontrolnu reproduktivnu uspješnost (na temelju ukupnog broja živih potomaka po roditeljskoj životinji koja je živa na kraju ispitivanja),

— grafički prikaz ukupnog broja živih potomaka po roditeljskoj životinji u svakom ponovljenom uzorku, isključujući sve slučajno ili nenamjerno uginule roditeljske životinje tijekom ispitivanja, u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije,

▼M7

— ako je to potrebno, grafički prikaz ukupnog broja živih potomaka po preživjeloj roditeljskog životinji u svakom ponovljenom uzorku u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije,

— ako je to potrebno, najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za reprodukciju, uključujući opis primijenjenih statističkih postupaka i pokazatelj veličine učinka za koju se očekuje da će biti detektirana (u tu se svrhu može provesti analiza snage prije početka pokusa) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za reprodukciju, informacije o varijabli odgovora upotrijebljenoj za izračun vrijednosti LOEC-a i NOEC-a (kao ukupan broj živih potomaka po majčinskom organizmu koji nije uginuo slučajno ili nenamjerno tijekom ispitivanja ili kao ukupan broj živih potomaka po preživjelom majčinskom organizmu), ako je to potrebno, trebalo bi dokumentirati i LOEC i NOEC za smrtnost roditeljskih životinja,

— ako je to potrebno, EC_x za reprodukciju i intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) te grafikon prilagođenog modela primijenjenog za izračun, nagib krivulje odgovora na koncentraciju i njezina standardna pogreška,

— drugi zapaženi biološki učinci ili mjerenja: treba dokumentirati sve druge zapažene ili izmjerene biološke učinke (npr. rast roditeljskih životinja), uključujući sva potrebna obrazloženja,

— objašnjenje svih odstupanja od ispitne metode.

LITERATURA

1. OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

2. OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

3. OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

4. OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

5. Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

6. Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

7. EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods.

8. Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

9. ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. U: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

10. Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. U: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) str. 144. – 148.

▼M7

11. Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

12. Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

13. OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

14. Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

15. Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije.

Slučajna smrtnost: smrtnost koja nije povezana s kemikalijom i koja je uzrokovana slučajnim događajem (odnosno uzrok je poznat).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ECx: koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u vodi čija je posljedica x %-tno smanjenje reprodukcije dafnija unutar navedenog razdoblja izlaganja.

Nenamjerna smrtnost: smrtnost koja nije povezana s kemikalijom i kojoj nije poznat uzrok.

Intrinzična stopa prirasta populacije: mjera rasta populacije kojom su objedinjene reproduktivna uspješnost i smrtnost specifična za dob (1., 2. i 3.). Ona će kod populacija u stabilnom stanju biti jednaka nuli. Kod rastućih populacija bit će pozitivna, a kod populacija koje se smanjuju negativna. Jasno je da potonje nisu održive i da je konačan rezultat izumiranje.

Granica detekcije: najniža koncentracija koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati.

Granica utvrđivanja: najniža koncentracija koja se može kvantitativno izmjeriti.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC): najniža ispitana koncentracija pri kojoj je unutar navedenog razdoblja izlaganja zapažen statistički značajan učinak kemikalije na reprodukciju i smrtnost roditeljskih životinja (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je zapažen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti detaljno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a).

Smrtnost: životinja se bilježi kao mrtva kada je nepomična, odnosno kada ne može plivati, ili ako nema vidljivih kretnji privjesaka ili postabdomena u roku od 15 sekundi nakon nježnog protresanja ispitnog spremnika (ako se primjenjuje druga definicija, trebalo bi je dokumentirati zajedno s upućivanjem).

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC): ispitna koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

Potomci: mlade dafnije dobivene od roditeljskih životinja u tijeku ispitivanja.

Roditeljska životinja: ženke dafnije koje su prisutne na početku ispitivanja i čija je reproduktivna uspješnost predmet istraživanja.

Reproduktivna uspješnost: broj živih potomaka dobivenih od roditeljskih životinja tijekom razdoblja ispitivanja.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

LITERATURA

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, str. 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Dodatak 2.

PRIPREMA POTPUNO DEFINIRANIH MEDIJA ELENDT M7 I M4

Aklimatizacija na medije Elendt M7 i M4

Neki su laboratoriji imali poteškoća s izravnim prijenosom dafnija u medije M4 (1.) i M7. Međutim, određeni je uspjeh postignut s postupnom aklimatizacijom, odnosno premještanjem iz vlastitog medija u 30 %-tni Elendt, zatim u 60 %-tni Elendt i zatim u 100 %-tni Elendt. Ponekad je potrebno razdoblje aklimatizacije i do mjesec dana.

Priprema

Elementi u tragovima

Prvo se pripremaju odvojene matične otopine (I.) pojedinih elemenata u tragovima u vodi prikladne čistoće, npr. u deioniziranoj ili destiliranoj vodi ili vodi pročišćenoj obrnutom osmozom. Iz tih različitih matičnih otopina (I.) priprema se druga pojedinačna matična otopina (II.) koja sadržava sve elemente u tragovima (kombinirana otopina) odnosno:

Matična otopina I. (pojedinačna tvar)	Količina koja se dodaje u vodu	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Za pripremu kombinirane matične otopine II. u vodu se dodaje sljedeća količina matične otopine I.	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000: 1	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000: 1	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000: 1	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000: 1	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000: 1	1,0	0,25
NaBr	320	20 000: 1	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000: 1	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000: 1	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000: 1	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000: 1	1,0	1,0
KI	65	20 000: 1	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000: 1	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000: 1	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000: 1	–	–
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000: 1	–	–
Otopine Na_2EDTA i $FeSO_4$ pripremaju se odvojeno, sjedinjavaju i odmah obrađuju u autoklavu. Pritom nastaje:				
Otopina Fe-EDTA		1 000: 1	20,0	5,0

▼**M7**

Mediji M4 i M7

Mediji M4 i M7 pripremaju se uporabom matične otopine II., makronutrijenata i vitamina kako slijedi:

	Količina koja se dodaje u vodu	Koncentracija (u odnosu na medij M4)	Količina matične otopine koja se dodaje za pripremu medija	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Matična otopina II. (kombinirani elementi u tragovima)		20: 1	50	50
Matična otopina makronutrijenata (pojedinačna tvar)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000: 1	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000: 1	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000: 1	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000: 1	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000: 1	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000: 1	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000: 1	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000: 1	0,1	0,1
Kombinirana vitaminska matična otopina	–	10 000: 1	0,1	0,1

Kombinirana vitaminska matična otopina priprema se dodavanjem triju vitamina u jednu litru vode kako je prikazano u nastavku:

	mg/l			
Tiamin hidroklorid	750	10 000: 1		
Cijanokobalamin (B_{12})	10	10 000: 1		
Biotin	7,5	10 000: 1		

Kombinirana vitaminska matična otopina čuva se zamrznuta u malim alikvotima. Vitamini se dodaju mediju neposredno prije uporabe.*N.B.*
Kako bi se izbjeglo taloženje soli kod pripreme potpunog medija, dodaju se alikvoti matičnih otopina u približno 500 – 800 ml deionizirane vode i zatim se nadopunjuje do jedne litre.

N.N.B. Medij M4 prvi se put navodi u Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Dodatak 3.

ANALIZA UKUPNOG ORGANSKOG UGLJIKA (TOC) I IZRADA NOMOGRAMA SADRŽAJA TOC-a U HRANI OD ALGI

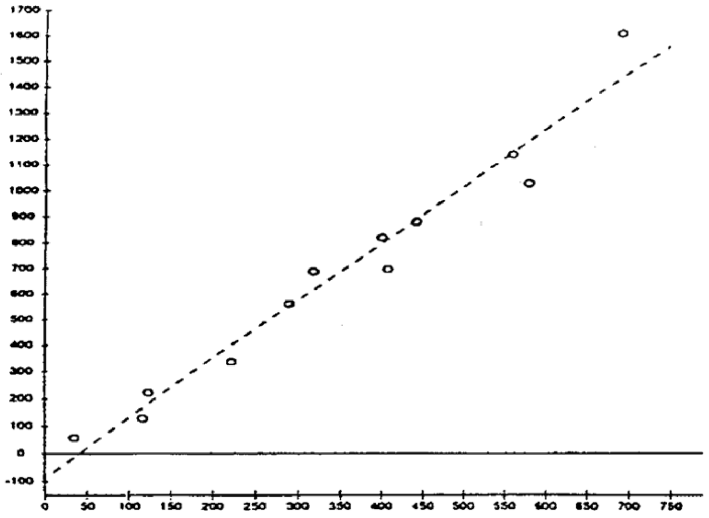
Priznato je da se sadržaj ugljika u hrani od algi uobičajeno ne mjeri izravno, nego iz korelacija (odnosno nomograma) sa zamjenskim mjerama, kao što su broj stanica algi i apsorpcija svjetlosti.

TOC bi trebalo mjeriti visokotemperaturnom oksidacijom, a ne metodama oksidacije UV zračenjem ili persulfatom (za savjet vidjeti: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Za izradu nomograma alge bi trebalo odvojiti od medija za uzgoj kulture centrifugiranjem i resuspendiranjem u destiliranoj vodi. U svakom se uzorku tri puta mjere zamjenski parametar i koncentracija TOC-a. Trebalo bi analizirati slijepe probe s destiliranom vodom i oduzeti koncentraciju TOC-a od koncentracije TOC-a u uzorku algi.

Nomogrami bi trebali biti linearni unutar traženog raspona koncentracija ugljika. Primjeri su prikazani u nastavku.

N.B. Primjeri se ne bi trebali upotrebljavati za preračunavanje; važno je da laboratoriji izrade vlastite nomograme.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

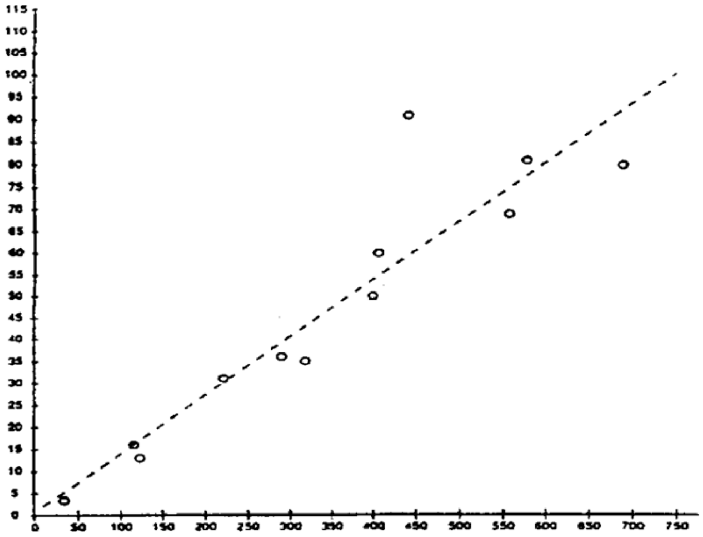
Regresija mg/l suhe mase na mg C/1. Podaci iz koncentriranih suspenzija stanica uzgojenih u polukontinuiranim serijama, resuspendiranih u destiliranoj vodi.

X-os: mg C/1 koncentrirane hrane od algi

Y-os: mg/1 suhe mase koncentrirane hrane od algi

Korekcijski koeficijent – 0,980

▼**M7**



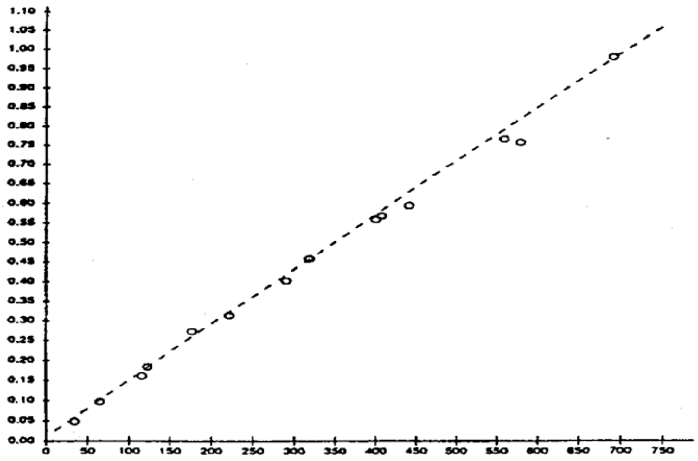
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresija broja stanica na mg C/1. Podaci iz koncentriranih suspenzija stanica uzgojenih u polukontinuiranim serijama, resuspendiranih u destiliranoj vodi.

X-os: mg C/1 koncentrirane hrane od algi

Y-os: Broj stanica/1 koncentrirane hrane od algi

Korekcijski koeficijent – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresija apsorpcije na mg C/1 (duljina puta od 1 cm). Podaci iz koncentriranih suspenzija stanica uzgojenih u polukontinuiranim serijama, resuspendiranih u destiliranoj vodi.

X-os: mg C/1 koncentrirane hrane od algi

Y-os: Apsorpcija koncentrirane hrane od algi razrijeđene u omjeru 1/10 pri 440 nm

Korekcijski koeficijent – 0,998

▼M7

Dodatak 4.

PRIMJER OBRASCA ZA DOSTAVU PODATAKA O OBNAVLJANJU MEDIJA, FIZIČKO-KEMIJSKOM PRAĆENJU, HRANJENJU, REPRODUKCIJI DAFNIJA I SMRTNOSTI RODITELJSKIH ŽIVOTINJA

Pokus br.:	Datum početka:						Klon:			Medij:				Vrsta hrane:				Ispitivana kemikalija:					Nazivna koncentracija:	
Dan	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.		
Obnavljanje medija (označiti kvačicom)																								
pH (*)																							novo	
																							staro	
O_2 (mg/l) (*)																							novo	
																							staro	
Temperatura (°C) (*)																							novo	
																							staro	
Hranjenje (označiti kvačicom)																								
Br. živih potomaka (**)																								Ukupno
Posuda 1.																								
2.																								
3.																								
4.																								
5.																								

▼M7

Pokus br.:	Datum početka:						Klon:			Medij:				Vrsta hrane:				Ispitivana kemikalija:					Nazivna koncentracija:	
Dan	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.		
6.																								
7.																								
8.																								
9.																								
10.																								
																							Ukupno	
Kumulativna smrtnost roditeljskih životinja (***)																								

(*) Navesti koja je posuda upotrijebljena za pokus.
(**) Upisati propala legla u odgovarajuće polje kao „AB”.
(***) Upisati smrtnost svih roditeljskih životinja u odgovarajuće polje kao „M”.

▼M7

Dodatak 5.

PRIMJER OBRASCA ZA DOSTAVU PODATAKA O REZULTATIMA KEMIJSKE ANALIZE

(a) **Izmjerene koncentracije**

Nazivna koncentracija	Uzorak iz prvog tjedna		Uzorak iz drugog tjedna		Uzorak iz trećeg tjedna	
	Svježe	Staro	Svježe	Staro	Svježe	Staro

(b) **Izmjerene koncentracije kao postotak nazivne koncentracije**

Nazivna koncentracija	Uzorak iz prvog tjedna		Uzorak iz drugog tjedna		Uzorak iz trećeg tjedna	
	Svježe	Staro	Svježe	Staro	Svježe	Staro

▼M7

Dodatak 6.

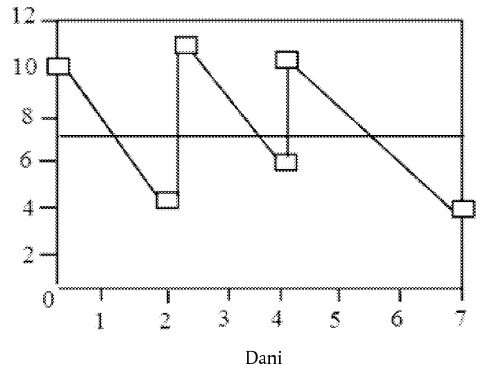
IZRAČUN VREMENSKI PONDERIRANE SREDNJE VRIJEDNOSTI

Vremenski ponderirana srednja vrijednost

Budući da se koncentracija ispitivane kemikalije može smanjiti u razdoblju između obnavljanja medija, potrebno je razmotriti koju bi koncentraciju trebalo odabrati kao reprezentativnu za raspon koncentracija kojima su izložene roditeljske dafnije. Odabir bi trebalo temeljiti na biološkim i statističkim čimbenicima. Na primjer, ako se smatra da na reprodukciju najviše utječe vršna koncentracija, trebalo bi upotrijebiti maksimalnu koncentraciju. Međutim, ako se smatra da je važniji akumulirani ili dugoročniji učinak toksične kemikalije, tada je relevantnija prosječna koncentracija. Prosječna koncentracija koju u tom slučaju treba upotrijebiti vremenski je ponderirana srednja koncentracija jer se njome uzima u obzir varijacija trenutačne koncentracije u određenom vremenu.

Slika 1.

Primjer vremenski ponderirane srednje vrijednosti



Na slici 1. prikazan je primjer (pojednostavnjenog) ispitivanja u trajanju od sedam dana s obnavljanjem medija 0., 2. i 4. dana.

— Tankom cik-cak linijom predstavljena je koncentracija u bilo kojoj točki u vremenu. Polazi se od pretpostavke da opadanje koncentracije slijedi eksponencijalni proces raspadanja.

— Pomoću šest ucrtanih točaka predstavljene su zapažene koncentracije izmjerene na početku i na kraju svakog razdoblja obnavljanja.

— Masno otisnutom crtom označen je položaj vremenski ponderirane srednje vrijednosti.

Vremenski ponderirana srednja vrijednost izračunava se tako da površina ispod vremenski ponderirane srednje vrijednosti bude jednaka površini ispod krivulje koncentracije. Izračun za gornji primjer prikazan je u tablici 1.

Tablica 1.

Izračun vremenski ponderirane srednje vrijednosti

Obnavljanje br.	Dani	Konc. 0.	Konc. 1.	Ln(Konc. 0.)	Ln(Konc. 1.)	Površina
1.	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2.	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3.	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Obnavljanje br.	Dani	Konc. 0.	Konc. 1.	Ln(Konc. 0.)	Ln(Konc. 1.)	Površina
Ukupni broj dana:	7				Ukupna površina:	50,092
					VP srednja vrijednost:	7,156

Dani su broj dana u razdoblju obnavljanja.

Konc. 0. je izmjerena koncentracija na početku svakog razdoblja obnavljanja.

Konc. 1. je izmjerena koncentracija na kraju svakog razdoblja obnavljanja.

Ln(Konc. 0.) je prirodni logaritam Konc. 0.

Ln(Konc. 1.) je prirodni logaritam Konc. 1.

Površina je površina ispod eksponencijalne krivulje za svako razdoblje obnavljanja. Izračunava se kao:

$$Površina = \frac{Konc\ 0 - Konc\ 1}{Ln(Konc\ 0) - Ln(Konc\ 1)} \times dan$$

Vremenski ponderirana srednja vrijednost (*VP srednja vrijednost*) *ukupna* je *površina* podijeljena s *ukupnim brojem dana*.

Naravno, u ispitivanju reproduktivne toksičnosti za dafnije tablicu bi trebalo proširiti na 21 dan.

Jasno je da kada se zapažanja bilježe samo na početku i na kraju svakog razdoblja obnavljanja, nije moguće potvrditi da je proces raspadanja doista eksponencijalan. Drukčija krivulja rezultirala bi drukčijim izračunom za *površinu*. Međutim, eksponencijalni proces raspadanja nije nevjerojatan te je u nedostatku drugih informacija vjerojatno najbolje upotrijebiti tu krivulju.

Ipak, potreban je oprez ako se kemijskom analizom na kraju razdoblja obnavljanja ne utvrdi prisutnost nikakve kemikalije. Ako se ne može procijeniti koliko je brzo kemikalija nestala iz otopine, nemoguće je dobiti realističnu površinu ispod krivulje, a time ni razumnu vremenski ponderiranu srednju vrijednost.

▼M7

Dodatak 7.

SMJERNICA ZA UTVRĐIVANJE SPOLA NOVOROĐENIH ŽIVOTINJA

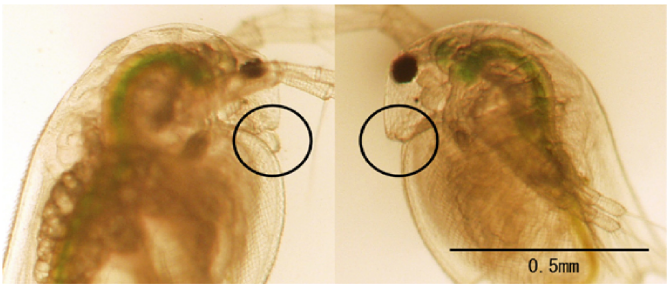
Do pojave novorođenih mužjaka može doći u promjenjivim okolišnim uvjetima, kao što su skraćivanje fotoperioda, temperatura, smanjenje koncentracije hrane i povećanje gustoće populacije (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Jednako tako, pojava mužjaka poznati je odgovor na određene regulatore rasta kukaca (Oda *et al*., 2005). U uvjetima u kojima se kemijskim stresorima izaziva smanjenje broja reproduktivnih potomaka partenogenih ženki bilo bi očekivano povećanje broja mužjaka (OECD, 2008). Na temelju raspoloživih informacija nije moguće predvidjeti koji će omjer spolova ili krajnji učinak povezan s reprodukcijom biti osjetljiviji; međutim, postoje pokazatelji (referentno „izvješće o validaciji" dio 1.) da bi to povećanje broja mužjaka moglo biti manje osjetljivo od smanjenja broja potomaka. Budući da je primarni cilj ispitne metode ocijeniti broj dobivenih potomaka, pojava mužjaka fakultativno je zapažanje. Ako se u istraživanju ocjenjuje ta fakultativna krajnja točka, trebalo bi upotrijebiti dodatni kriterij valjanosti ispitivanja od najviše 5 % mužjaka u kontrolama.

Spol dafnija najpraktičnije i najjednostavnije se utvrđuje na temelju njihovih fenotipskih obilježja jer su mužjaci i ženke genetski identični te je njihov spol određen okolišem. Mužjaci i ženke razlikuju se prema dužini i morfologiji prvih ticala, koja su kod mužjaka duža nego kod ženki (slika 1.). Ta je razlika prepoznatljiva odmah nakon rođenja, a tijekom daljnjeg rasta razvijaju se i druga sekundarna spolna obilježja (vidjeti, na primjer, sliku 2. u Olmstead and LeBlanc, 2000).

Za zapažanja povezana s morfološkim spolom, novorođene potomke svake pokusne životinje trebalo bi pipetom premjestiti u petrijevu zdjelicu s ispitnim medijem. Količina medija minimalna je kako bi se ograničilo kretanje životinja. Zapažanja prvih ticala mogu se provesti stereomikroskopom (× 10 – 60).

Slika 1.

Mužjak (lijevo) i ženka (desno) vrste *D. magna* stari 24 sata. Mužjaci se razlikuju od ženki prema dužini i morfologiji prvih ticala kako je prikazano u krugovima (Tatarazako *et al*., 2004).



LITERATURA

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. MIKROORGANIZMI KOJI ŽIVE U TLU: TEST PRETVORBE DUŠIKA

1. METODA

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD TG 216 (2000.).

1.1. UVOD

U ovoj ispitnoj metodi opisana je laboratorijska metoda za ispitivanje dugotrajnih učinaka kemikalija na aktivnost pretvorbe dušika mikoorganizama koji žive u tlu nakon jednokratnog izlaganja. Test se prvenstveno temelji na preporukama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (1). Ipak, uzete su u obzir i druge smjernice, uključujući smjernice njemačke Biologische Bundesanstalt (2), Američke agencije za zaštitu okoliša (3), SETAC-a (4) i Međunarodne organizacije za normizaciju (5). Na radionici OECD-a o odabiru tala/sedimenata održanoj u talijanskom Belgiratu 1995. (6) dogovoreni su broj i vrste tla koje će se koristiti u ovom testu. Preporuke za skupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka tla temelje se na smjernici ISO (7) i preporukama radionice iz Belgirata. Kod ocjenjivanja i vrednovanja toksičnih svojstava ispitivanih tvari ponekad je potrebno odrediti učinke na mikrobnu aktivnost tla, npr. ako su potrebni podaci o mogućim nuspojavama sredstava za zaštitu bilja u mikroflori tla ili, kod drugih kemikalija, ako se očekuje izlaganje mikroorganizama kemikaliji. Test pretvorbe dušika provodi se u svrhu određivanja učinaka tih kemikalija na mikrofloru tla. Ako se ispituju agrokemikalije (npr. sredstva za zaštitu bilja, gnojiva, kemikalije koje se koriste u šumarstvu), provodi se i test pretvorbe dušika i test pretvorbe ugljika. Ako se ispituju druge kemikalije, dovoljno je provesti test pretvorbe dušika. Ipak, ako se testom pretvorbe dušika kod tih kemikalija dobiju vrijednosti EC_{50} unutar područja utvrđenog za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapirin), može se provesti i test pretvorbe ugljika kako bi se dobile dodatne informacije.

Tla se sastoje od živih i neživih komponenti koje se javljaju u složenim i heterogenim mješavinama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razlaganju i pretvorbi organske tvari u plodnim tlima, a njihove brojne vrste doprinose različitim aspektima plodnosti tla. Bilo kakvo dugotrajno uplitanje u te biokemijske procese može utjecati na kruženje nutrijenata i tako promijeniti plodnost tla. Pretvorba ugljika i dušika odvija se u svim plodnim tlima. Iako su u različitim tlima za te procese odgovorne različite mikrobne zajednice, putevi pretvorbe su uglavnom isti.

Opisana ispitna metoda namijenjena je utvrđivanju dugotrajnih štetnih učinaka tvari na proces pretvorbe dušika u aerobnim površinskim tlima. Ona također omogućuje procjenu učinaka tvari na pretvorbu ugljika koju obavlja mikroflora tla. Tvorba nitrata odvija se nakon raspadanja ugljično-dušičnih veza. Stoga, ako se u obrađenim i kontrolnim tlima utvrde jednake stope proizvodnje nitrata, velika je vjerojatnost da su glavni putevi razgradnje ugljika netaknuti i u funkciji. Supstrat odabran za ovaj test (lucernino brašno u prahu) ima povoljan omjer ugljika i dušika (obično između 12/1 i 16/1). Zahvaljujući tomu, smanjen je nedostatak ugljika tijekom ispitivanja tako da se mikrobne zajednice koje ošteti kemikalija mogu se oporaviti u roku 100 dana.

▼B

Testovi iz kojih je izvedena ova ispitna metoda bili su prvenstveno namijenjeni tvarima kod kojih se može predvidjeti količina koja će dospjeti u tlo. To je primjerice slučaj kod sredstava za zaštitu bilja kod kojih je poznata količina primjene u polju. Kod agrokemikalija je dovoljno ispitati dvije relevantne doze s obzirom na očekivanu odnosno predviđenu količinu primjene. Agrokemikalije se mogu ispitivati kao aktivne tvari (a.i.) ili kao formulirani proizvodi. Ipak, test nije ograničen na agrokemikalije. Promjenom količina ispitivane tvari koje se primijenjuju na tlo i načina vrednovanja podataka test se može koristiti i kod kemikalija kod kojih nije poznata očekivana količina tvari koja će dospjeti u tlo. Tako se kod kemikalija različitih od agrokemikalija određuju učinci niza koncentracija na pretvorbu dušika. Podaci iz tih ispitivanja koriste se za izradu krivulje doza-odgovor i izračunavanje vrijednosti EC_x, gdje je x definirani % učinka.

1.2. DEFINICIJE

Pretvorba dušika: potpuna razgradnja organske tvari koja sadrži dušik djelovanjem mikroorganizama u procesu amonifikacije i nitrifikacije u odgovarajući anorganski krajnji proizvod, nitrat.

EC_x (učinkovita koncentracija): koncentracija ispitivane tvari u tlu koja rezultira x-postotnom inhibicijom pretvorbe dušika u nitrat.

EC_{50} (medijan učinkovite koncentracije): koncentracija ispitivane tvari u tlu koja rezultira 50-postotnom (50 %) inhibicijom pretvorbe dušika u nitrat.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema.

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Prosijano se tlo obogati biljnim brašnom u prahu i obradi ispitivanom tvari ili ostavi neobrađeno (kontrola). Ako se ispituju agrokemikalije, preporučuju se najmanje dvije ispitne koncentracije, koje treba odabrati s obzirom na najvišu očekivanu koncentraciju u polju. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije uzorci obrađenih i kontrolnih tala ekstrahiraju se odgovarajućim otapalom te se odrede količine nitrata u ekstraktima. Stopa tvorbe nitrata obrađenih uzoraka usporedi se sa stopom kontrolnih uzoraka i izračuna se postotak odstupanja obrađenih uzoraka od kontrolne vrijednosti. Sva ispitivanja traju najmanje 28 dana. Ako su 28. dana razlike između obrađenih i neobrađenih tala jednake ili veće od 25 %, mjerenja se nastavljaju do najviše 100 dana. Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, uzorcima tla doda se niz koncentracija ispitivane tvari i nakon 28 dana inkubacije izmjere se količine nitrata nastale u obrađenim i kontrolnim uzorcima. Rezultati ispitivanja s više koncentracija analiziraju se pomoću regresijskog modela i izračunaju vrijednosti EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} i/ili EC_{10}). Vidjeti definicije.

1.5. VALJANOST ISPITIVANJA

Vrednovanja rezultata ispitivanja s agrokemikalijama temelje se na relativno malim razlikama (tj. prosječna vrijednost ± 25 %) između koncentracija nitrata u kontrolnim i obrađenim uzorcima tla, tako da velike razlike u kontrolama mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Stoga razlike između ponavljanja u kontroli trebaju biti manje od ± 15 %.

▼B

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Aparatura**

Koriste se ispitne posude izrađene od kemijski inertnog materijala. Njihova zapremnina treba biti prikladna za postupak koji se primjenjuje kod inkubacije tla tj. inkubacija zbirnog uzorka ili inkubacija niza pojedinačnih uzoraka tla (vidjeti odjeljak 1.7.1.2.). Treba paziti da se gubitak vode svede na najmanju moguću mjeru i da se omogući izmjena plinova za vrijeme ispitivanja (npr. ispitne se posude mogu prekriti perforiranom polietilenskom folijom). Ako se ispituju hlapljive tvari, treba koristiti plinonepropusne posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Njihova veličina treba biti takva da uzorak tla ispuni približno jednu četvrtinu njihove zapremnine.

Koristi se standardna laboratorijska oprema, uključujući:

— uređaj za tresenje: mehanička tresilica ili istovjetna oprema,

— centrifugu (3 000 g) ili uređaj za filtriranje (s filtar-papirom bez nitrata),

— instrument odgovarajuće osjetljivosti i obnovljivosti za analizu nitrata.

1.6.2. **Odabir i broj tala**

Koristi se jedno tlo. Preporučena svojstva tla su:

— sadržaj pijeska: najmanje 50 % i najviše 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— sadržaj organskog ugljika: 0,5–1,5 %,

— treba izmjeriti mikrobnu biomasu (8)(9) i njezin sadržaj ugljika treba iznositi najmanje 1 % ukupnog organskog ugljika tla.

U većini slučajeva tlo s ovakvim svojstvima predstavlja najgori mogući slučaj, budući da je adsorpcija ispitivane kemikalije minimalna i njezina raspoloživost za mikrofloru maksimalna. Stoga općenito nisu potrebna ispitivanja s drugim tlima. Ipak, pod određenim okolnostima, npr. ako se očekuje da će se ispitivana tvar uglavnom koristiti u određenim vrstama tla, kao što su kisela šumska tla, ili kod elektrostatički nabijenih kemikalija ponekad je potrebno upotrijebiti dodatno tlo.

▼B

1.6.3. **Skupljanje i skladištenje uzoraka tla**

1.6.3.1. *Skupljanje*

Trebaju biti raspoložive detaljne informacije o povijesti lokaliteta gdje se uzima tlo za ispitivanje. To uključuje točno mjesto, vegetacijski pokrov, datume tretiranja sredstvima za zaštitu bilja i organskim i anorganskim gnojivima, dodatke biološkog materijala i slučajna onečišćenja. Mjesto odabrano za uzimanje tla treba biti prikladno za dugotrajno korištenje. Prikladni su trajni pašnjaci, polja s godišnjim kulturama žitarica (osim kukuruza) ili gusto posijanom zelenom gnojidbom. Odabrano mjesto ne smije biti tretirano sredstvima za zaštitu bilja najmanje jednu godinu prije uzimanja uzorka. Osim toga, organska gnojiva se ne smiju primjenjivati najmanje šest mjeseci prije uzorkovanja. Uporaba mineralnih gnojiva prihvatljiva je samo ako je to u skladu sa zahtjevima kulture, a uzorci tla ne smiju se uzimati najmanje tri mjeseca nakon primjene gnojiva. Treba izbjegavati korištenje tla tretiranoga gnojivima s poznatim biocidnim učincima (npr. kalcijev cijanamid).

Treba izbjegavati uzorkovanje tijekom ili neposredno nakon dugih razdoblja suše (duže od 30 dana) ili poplave. Kod oranih tala uzorke treba uzeti na dubini od 0 do 20 cm. Kod travnatih površina (pašnjaka) i drugih tala koja se ne oru u dužim razdobljima (najmanje jedna sezona) maksimalna dubina uzorkovanja može biti malo veća od 20 cm (npr. do 25 cm).

Uzorke tla treba prenositi u spremnicima u temperaturnim uvjetima koji jamče da se početna svojstva tla neće značajno promijeniti.

1.6.3.2. *Skladištenje*

Poželjno je koristiti tla koja su svježe skupljena na terenu. Ako se ne može izbjeći skladištenje u laboratoriju, tla se mogu skladištiti u mraku na 4 ± 2 °C najviše tri mjeseca. Za vrijeme skladištenja tla treba osigurati aerobne uvjete. Ako se uzorci tla uzimaju s površina koje su zamrznute najmanje tri mjeseca godišnje, može doći u obzir i skladištenje na minus 18 °C do minus 22 °C u trajanju od šest mjeseci. Mikrobna biomasa uskladištenih tala mjeri se prije svakog pokusa, a sadržaj ugljika u biomasi treba iznositi najmanje 1 % ukupnog sadržaja organskog ugljika tla (vidjeti odjeljak 1.6.2.).

1.6.4. **Rukovanje i priprema tla za ispitivanje**

1.6.4.1. *Predinkubacija*

Ako je tlo bilo uskladišteno (vidjeti odjeljak 1.6.3.2.), preporučuje se predinkubacija u trajanju između 2 i 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage tla tijekom predinkubacije trebaju biti slični temperaturi i sadržaju vlage kod ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.6.4.2. i 1.7.1.3.).

▼B

1.6.4.2. *Fizikalno-kemijska svojstva*

Tlo se ručno očisti od krupnih predmeta (npr. kamenje, dijelovi biljaka itd.) i zatim se vlažno prosije bez pretjeranog isušivanja na veličinu čestica do najviše 2 mm. Sadržaj vlage uzorka tla treba podesiti pomoću destilirane ili deionizirane vode na vrijednost između 40 % i 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta.

1.6.4.3. *Obogaćivanje organskim supstratom*

Tlo treba obogatiti prikladnim organskim supstratom npr. travnatozelenim brašnom lucerne u prahu (glavni sastojak: *Medicago sativa*) s omjerom C/N između 12/1 i 16/1. Preporučeni omjer lucerna – tlo je 5 g lucerne na kilogram tla (suhe mase).

1.6.5. **Priprema ispitivane tvari za primjenu na tlo**

Ispitivana se tvar u pravilu primjenjuje pomoću nosača. Nosač može biti voda (kod tvari topljivih u vodi) ili inertna kruta tvar, kao što je sitni kremeni pijesak (veličina čestica: 0,1–0,5 mm). Treba izbjegavati sve tekuće nosače osim vode (npr. organska otapala kao što je aceton, kloroform) jer oni mogu oštetiti mikrofloru. Ako se kao nosač koristi pijesak, on se može obložiti ispitivanom tvari otopljenom ili suspendiranom u odgovarajućem otapalu. U tom slučaju otapalo treba ukloniti isparavanjem prije miješanja s tlom. Za optimalnu razdiobu ispitivane tvari u tlu preporučuje se omjer od 10 g pijeska po kilogramu tla (suhe mase). Kontrolni se uzorci obrađuju samo odgovarajućom količinom vode i/ili kremenog pijeska.

Kod ispitivanja hlapljivih kemikalija treba izbjegavati gubitke tijekom obrade, u mjeri u kojoj je to moguće, te nastojati osigurati homogenu razdiobu u tlu (npr. ispitivanu tvar treba ubrizgati u tlo na nekoliko mjesta).

1.6.6. **Ispitne koncentracije**

Ako se ispituju agrokemikalije, treba koristiti najmanje dvije koncentracije. Niža koncentracija ne smije biti manja od očekivane maksimalne količine koja će dospjeti u tlo u stvarnim uvjetima primjene, dok viša koncentracija treba biti višekratnik niže koncentracije. Koncentracije ispitivane tvari koje se dodaju u tlo izračunavaju se uz pretpostavku jednolikog ulaganja do dubine od 5 cm i nasipne gustoće tla od 1,5. Kod agrokemikalija koje se izravno primjenjuju na tlo i kod kemikalija kod kojih se može predvidjeti količina koja će dospjeti u tlo preporučene ispitne koncentracije su maksimalna predviđena koncentracija u okolišu (Predicted Environmental Concentraction, PEC) i njezina peterostruka vrijednost. Tvari kod kojih se očekuje više primjena u jednoj sezoni treba ispitati u koncentracijama koje se dobiju množenjem PEC-a maksimalnim očekivanim brojem primjena. Ipak, gornja koncentracija koja se ispituje smije biti najviše 10 puta veća od maksimalne količine jedne primjene. Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, koristi se geometrijski niz od najmanje pet koncentracija. Ispitne koncentracije trebaju obuhvaćati područje potrebno za određivanje vrijednosti EC_x.

▼B

1.7. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.7.1. **Uvjeti izlaganja**

1.7.1.1. *Obrada i kontrola*

Ako se ispituju agrokemikalije, tlo se podijeli u tri dijela jednake mase. Dva se dijela pomiješaju s nosačem koji sadrži proizvod, a treći se pomiješa s nosačem bez proizvoda (kontrola). Preporučuju se najmanje po tri ponavljanja, kako kod obrađenog tako i kod neobrađenog tla. Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, tlo se podijeli u šest dijelova jednake mase. Pet se uzoraka pomiješa s nosačem koji sadrži ispitivanu tvar, a šesti se pomiješa s nosačem bez kemikalije. Preporučuju se po tri ponavljanja za obrađene uzorke i kontrolu. Treba paziti da se osigura homogena razdioba ispitivane tvari u obrađenim uzorcima tla. Kod miješanja treba izbjegavati zbijanje i grudanje tla.

1.7.1.2. *Inkubacija uzoraka tla*

Inkubacija uzoraka tla može se provesti na dva načina: u zbirnim uzorcima svakog obrađenog i neobrađenog tla ili kao niz pojedinačnih poduzoraka jednake veličine svakog obrađenog i neobrađenog tla. Ipak, ako se ispituju hlapljive tvari, ispitivanje se uvijek provodi s nizom pojedinačnih poduzoraka. Ako se tla inkubiraju zbirno, pripreme se velike količine svakog obrađenog i neobrađenog tla i tijekom ispitivanja uzimaju poduzorci za analizu prema potrebi. Početna količina koju treba pripremiti za sve obrade i kontrolu ovisi o veličini poduzoraka, broju ponavljanja koja se koriste u analizi i očekivanom maksimalnom broju uzorkovanja. Tla koja se inkubiraju zbirno treba dobro promiješati prije uzimanja poduzoraka. Ako se tla inkubiraju kao niz pojedinačnih uzoraka tla, svako se obrađeno i neobrađeno zbirno tlo podijeli u potreban broj poduzoraka, koji se koriste prema potrebi. Kod pokusa gdje se očekuje više od dva vremena uzorkovanja treba pripremiti dovoljno poduzoraka za sva ponavljanja i sva vremena uzorkovanja. Treba inkubirati najmanje tri paralelna uzorka ispitivanog tla u aerobnim uvjetima (vidjeti odjeljak 1.7.1.1.). Kod svih ispitivanja treba koristiti prikladne posude s dovoljno plinskog prostora kako ne bi nastali anaerobni uvjeti. Ako se ispituju hlapljive tvari, ispitivanje se uvijek provodi s nizom pojedinačnih poduzoraka.

1.7.1.3. *Ispitni uvjeti i trajanje*

Ispitivanje se provodi u mraku na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 C°. Sadržaj vlage u uzorcima tla za vrijeme ispitivanja treba održavati između 40 % i 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta tla (vidjeti odjeljak 1.6.4.2.) uz toleranciju od ± 5 %. Prema potrebi se može dodati destilirana ili deionizirana voda.

Ispitivanje traje najmanje 28 dana. Ako se ispituju agrokemikalije, uspoređuju se stope tvorbe nitrata u obrađenim i kontrolnim uzorcima. Ako se one 28. dana razlikuju za više od 25 %, ispitivanje se nastavlja dok se ne dobije razlika od 25 % ili manja ili najviše 100 dana, ovisno o tome što je kraće. Kod ostalih se kemikalija ispitivanje prekida nakon 28 dana. 28. dana se odrede količine nitrata u obrađenim i kontrolnim uzorcima tla i izračunaju vrijednosti EC_x.

▼B

1.7.2. **Uzorkovanje i analiziranje tala**

1.7.2.1. *Raspored uzorkovanja tla*

Ako se ispituju agrokemikalije, uzorci tla se analiziraju na nitrat 0., 7., 14. i 28. dana. Ako je potrebno duže ispitivanje, daljnja mjerenja nakon 28. dana treba obavljati u razmacima od 14 dana.

Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, koristi se najmanje pet ispitnih koncentracija i uzorci tla se analiziraju na nitrat na početku (0. dan) i kraju razdoblja izlaganja (28 dana). Prema potrebi se može dodati i međumjerenje, npr. 7. dana. Podaci dobiveni 28. dana koriste se za određivanje vrijednosti EC_x kemikalije. Podaci kontrolnih uzoraka 0. dana mogu se, po želji, navesti u izvješću kao početna količina nitrata u tlu.

1.7.2.2. *Analiza uzoraka tla*

Nastala količina nitrata u svakom obrađenom i kontrolnom uzorku određuje se u svakom vremenu uzorkovanja. Nitrat se ekstrahira iz tla tresenjem uzoraka s odgovarajućim ekstrakcijskim otapalom npr. otopina 0,1 M kalijevog klorida. Preporučuje se omjer 5 ml otopine KCl na gram ekvivalenta suhe mase tla. Da bi se postigla optimalna ekstrakcija, posude u kojima se nalazi tlo i ekstrakcijska otopina smiju biti napunjene najviše do pola. Smjese se tresu 60 minuta na 150 o/min. Smjese se centrifugiraju ili filtriraju i tekuće faze analiziraju na nitrat. Tekući ekstrakti bez čestica mogu se prije analize pohraniti na minus 20 ± 5 °C do najviše šest mjeseci.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Kod ispitivanja s agrokemikalijama treba zabilježiti nastalu količinu nitrata u svakom uzorku tla i u tabličnom obliku navesti srednje vrijednosti svih ponavljanja. Stope pretvorbe dušika treba ocijeniti odgovarajućim opće prihvaćenim statističkim metodama (npr. F test, razina značajnosti 5 %). Nastale količine nitrata izražavaju se u mg nitrata po kg suhe mase tla po danu. Stope tvorbe nitrata u svakoj obradi usporede se s kontrolom i izračuna se postotak odstupanja od kontrolne vrijednosti.

Ako se ispitivanja provode s kemikalijama različitim od agrokemikalija, odredi se nastala količina nitrata u svakom ponavljanju i izradi krivulja doza-odgovor za procjenu vrijednosti EC_x. Količine nitrata (tj. mg nitrata/kg suhe mase tla) utvrđene u obrađenim uzorcima nakon 28 dana usporede se s kontrolom. Iz tih se podataka izračunaju postoci inhibicije za svaku ispitnu koncentraciju. Ti se postoci grafički prikažu u ovisnosti o koncentraciji i primijene statistički postupci za izračun vrijednosti EC_x. Granice pouzdanosti ($p = 0,95$) za izračunani EC_x također se određuju primjenom standardnih postupaka (10)(11)(12).

Ispitivane tvari koje sadrže velike količine dušika mogu doprinijeti tvorbi nitrata tijekom ispitivanja. Ako se te tvari ispituju u visokoj koncentraciji (npr. kemikalije kod kojih se očekuju ponovljene primjene) u ispitivanje treba uključiti odgovarajuće kontrole (tj. tlo s ispitivanom tvari, ali bez biljnog brašna). Podatke tih kontrola treba uzeti u obzir kod izračuna EC_x.

▼B

2.2. TUMAČENJE REZULTATA

Ako se kod vrednovanja rezultata ispitivanja s agrokemikalijama pokaže da je u bilo kojem vremenu uzorkovanja nakon 28. dana razlika u stopama tvorbe nitrata između niže obrade (tj. maksimalne predviđene koncentracije) i kontrole jednaka ili manja od 25 %, može se ocijeniti da proizvod nema dugotrajni utjecaj na pretvorbu dušika u tlu. Kad se vrednuju rezultati ispitivanja s drugim kemikalijama koriste se vrijednosti EC_{50}, EC_{25} i/ili EC_{10}.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

potpune podatke o upotrijebljenom tlu, uključujući:

— geografske koordinate lokaliteta (širina, dužina),

— informacije o povijesti lokaliteta (npr. vegetacijski pokrov, tretiranje sredstvima za zaštitu bilja, tretiranje gnojivima, slučajno onečišćenje itd.),

— način korištenja (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd.),

— dubinu uzorkovanja (cm),

— sadržaj pijeska/praha/gline (% suhe mase),

— pH (u vodi),

— sadržaj organskog ugljika (% suhe mase),

— sadržaj dušika (% suhe mase),

— početnu koncentraciju nitrata (mg nitrata/kg suhe mase),

— kapacitet izmjene kationa (mmol/kg),

— mikrobnu biomasu u postotku ukupnog organskog ugljika,

— uputu na metode korištene za određivanje pojedinih parametara,

— sve informacije vezane uz skupljanje i skladištenje uzoraka tla,

— podatke o predinkubaciji tla (prema potrebi).

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući, prema potrebi, strukturnu formulu, čistoću (kod sredstava za zaštitu bilja postotak aktivne tvari), sadržaj dušika.

Supstrat:

— podrijetlo supstrata,

— sastav (tj. brašno lucerne, travnatozeleno brašno lucerne),

— sadržaj ugljika, dušika (% suhe mase),

— veličina sita (mm).

▼B

Uvjeti ispitivanja:

— podaci o obogaćivanju tla organskim supstratom,

— broj koncentracija ispitivane kemikalije i, prema potrebi, obrazloženje odabranih koncentracija,

— podaci o primjeni ispitivane tvari na tlo,

— temperatura inkubacije,

— sadržaj vlage u tlu na početku i za vrijeme ispitivanja,

— metoda inkubacije tla (tj. zbirni uzorak ili niz pojedinačnih poduzoraka),

— broj ponavljanja,

— vremena uzorkovanja,

— metoda ekstrakcije nitrata iz tla.

Rezultati:

— analitički postupak i oprema korištena za analizu nitrata,

— tablični podaci, uključujući pojedinačne i srednje vrijednosti mjerenja nitrata,

— odstupanje između ponavljanja kod obrađenih i kontrolnih uzoraka,

— obrazloženje korekcija izračuna, prema potrebi,

— postotak odstupanja stopa tvorbe nitrata u svakom vremenu uzorkovanja odnosno, prema potrebi, vrijednost EC_{50} s granicom pouzdanosti 95 %, drugi EC_x (tj. EC_{25} ili EC_{10}) s intervalima pouzdanosti i graf krivulje doza-odgovor,

— statistička obrada rezultata,

— sve informacije i zapažanja korisna za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995) Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

▼B

(6) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993) Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, str. 99-113.

(11) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MIKROORGANIZMI KOJI ŽIVE U TLU: TEST PRETVORBE UGLJIKA

1. METODA

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG 217 (2000.).

1.1. UVOD

U ovoj ispitnoj metodi opisana je laboratorijska metoda za ispitivanje potencijalnih dugotrajnih učinaka sredstava za zaštitu bilja i mogućih drugih kemikalija na aktivnost pretvorbe ugljika mikoorganizama koji žive u tlu kod jednokratnog izlaganja. Test se prvenstveno temelji na preporukama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (1). Ipak, uzete su u obzir i druge smjernice, uključujući smjernice njemačke Biologische Bundesanstalt (2), Američke agencije za zaštitu okoliša (3) i SETAC-a (4). Na radionici OECD-a o odabiru tala/sedimenata održanoj u talijanskom Belgiratu 1995. (5) dogovoreni su broj i vrste tla koje će se koristiti u ovom testu. Preporuke za skupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka tla temelje se na smjernici ISO (6) i preporukama radionice iz Belgirata.

Kod ocjenjivanja i vrednovanja toksičnih svojstava ispitivanih tvari ponekad je potrebno odrediti učinke na mikrobnu aktivnost tla, npr. ako su potrebni podaci o mogućim nuspojavama sredstava za zaštitu bilja u mikroflori tla ili, kod drugih kemikalija, ako se očekuje izlaganje mikroorganizama kemikaliji. Test pretvorbe ugljika provodi se u svrhu određivanja učinaka tih kemikalija na mikrofloru tla. Ako se ispituju agrokemikalije (npr. sredstva za zaštitu bilja, gnojiva, kemikalije koje se koriste u šumarstvu), provodi se i test pretvorbe ugljika i test pretvorbe dušika. Ako se ispituju druge kemikalije, dovoljno je provesti test pretvorbe dušika. Ipak, ako se testom pretvorbe dušika kod tih kemikalija dobiju vrijednosti EC_{50} unutar područja utvrđenog za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapirin), može se provesti i test pretvorbe ugljika kako bi se dobile dodatne informacije.

Tla se sastoje od živih i neživih komponenti koje se javljaju u složenim i heterogenim mješavinama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razlaganju i pretvorbi organske tvari u plodnim tlima, a njihove brojne vrste doprinose različitim aspektima plodnosti tla. Bilo kakvo dugotrajno uplitanje u te biokemijske procese može ometati kruženje nutrijenata i tako promijeniti plodnost tla. Pretvorba ugljika i dušika odvija se u svim plodnim tlima. Iako su u različitim tlima za te procese odgovorne različite mikrobne zajednice, putevi pretvorbe su uglavnom isti.

▼B

Ova ispitna metoda namijenjena je utvrđivanju dugotrajnih štetnih učinaka tvari na proces pretvorbe ugljika u aerobnim površinskim tlima. Test je osjetljiv na promjene veličine i aktivnosti mikrobnih zajednica odgovornih za pretvorbu ugljika budući da ih on istodobno izlaže kemijskom stresu i nedostatku ugljika. Koristi se pjeskovito tlo siromašno organskim tvarima. Tlo se obrađuje ispitivanom tvari i inkubira u uvjetima koji omogućuju brzi mikrobni metabolizam. U tim se uvjetima izvori lako dostupnog ugljika brzo troše. Uslijed toga dolazi do pomanjkanja ugljika, što ubija stanice mikroorganizama i izaziva dormanciju i/ili sporulaciju. Ako ispitivanje traje više od 28 dana, zbroj tih reakcija može se izmjeriti u kontrolama (s neobrađenim tlom) kao progresivni gubitak metabolički aktivne mikrobne biomase (7). Ako u ispitnim uvjetima na biomasu tla koje je izloženo ugljičnom stresu utječe i prisutnost kemikalije, ona se možda neće vratiti na istu razinu kao u kontroli. Stoga poremećaji koje izazove ispitivana tvar u bilo kom trenutku za vrijeme ispitivanja često traju do kraja ispitivanja.

Testovi iz kojih je izvedena ova ispitna metoda bili su prvenstveno namijenjeni tvarima kod kojih se može predvidjeti količina koja će dospjeti u tlo. To je primjerice slučaj kod sredstava za zaštitu bilja kod kojih je poznata količina primjene u polju. Kod agrokemikalija je dovoljno ispitati dvije relevantne doze s obzirom na očekivanu odnosno predviđenu količinu primjene. Agrokemikalije se mogu ispitivati kao aktivne tvari (a.i.) ili kao formulirani proizvodi. Ipak, test nije ograničen na kemikalije s predvidivim koncentracijama u okolišu. Promjenom količina ispitivane tvari koje se primijenjuju na tlo i načina vrednovanja podataka test se može koristiti i kod kemikalija kod kojih nije poznata očekivana količina tvari koja će dospjeti u tlo. Tako se kod kemikalija različitih od agrokemikalija određuju učinci niza koncentracija na pretvorbu ugljika. Podaci iz tih ispitivanja koriste se za izradu krivulje doza-odgovor i izračunavanje vrijednosti EC_x, gdje je x definirani % učinka.

1.2. DEFINICIJE

Pretvorba ugljika: razgradnja organske tvari djelovanjem mikroorganizama pri kojoj nastaje anorganski krajnji proizvod, ugljikov dioksid.

EC_x (učinkovita koncentracija): koncentracija ispitivane tvari u tlu koja rezultira x %-tnom inhibicijom pretvorbe ugljika u ugljikov dioksid.

EC_{50} (medijan učinkovite koncentracije): koncentracija ispitivane tvari u tlu koja rezultira 50 %-tnom inhibicijom pretvorbe ugljika u ugljikov dioksid.

1.3. REFERENTNE TVARI

Nema.

▼B

1.4. NAČELO ISPITNE METODE

Prosijano se tlo obradi ispitivanom tvari ili ostavi neobrađeno (kontrola). Ako se ispituju agrokemikalije, preporučuju se najmanje dvije ispitne koncentracije, koje treba odabrati s obzirom na najvišu očekivanu koncentraciju u polju. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije uzorci obrađenih i kontrolnih tala pomiješaju se s glukozom i mjere se stope disanja induciranoga glukozom tijekom 12 uzastopnih sati. Stope disanja izražavaju se kao oslobođeni ugljikov dioksid (mg ugljikovog dioksida/kg suhog tla/h) ili potrošeni kisik (mg kisika/kg suhog tla/h). Srednja stopa disanja obrađenih uzoraka tla usporedi se s kontrolom i izračuna se postotak odstupanja obrađenih uzoraka od kontrolne vrijednosti. Sva ispitivanja traju najmanje 28 dana. Ako su 28. dana razlike između obrađenih i neobrađenih tala jednake ili veće od 25 %, mjerenja se nastavljaju u razmacima od 14 dana do najviše 100 dana. Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, uzorcima tla doda se niz koncentracija ispitivane tvari i nakon 28 dana izmjere se stope disanja induciranoga glukozom (tj. srednja vrijednost količina nastalog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika). Rezultati ispitivanja s nizom koncentracija analiziraju se pomoću regresijskog modela i izračunaju se vrijednosti EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} i/ili EC_{10}). Vidjeti definicije.

1.5. VALJANOST ISPITIVANJA

Vrednovanja rezultata ispitivanja s agrokemikalijama temelje se na relativno malim razlikama (tj. prosječna vrijednost ± 25 %) između količina oslobođenog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika u kontrolnim i obrađenim uzorcima tla, tako da velike razlike u kontrolama mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Stoga razlike između ponavljanja u kontroli trebaju biti manje od ± 15 %.

1.6. OPIS ISPITNE METODE

1.6.1. **Aparatura**

Koriste se ispitne posude izrađene od kemijski inertnog materijala. Njihova zapremnina treba biti prikladna za postupak koji se primjenjuje kod inkubacije tla tj. inkubacija zbirnog uzorka ili inkubacija niza pojedinačnih uzoraka tla (vidjeti odjeljak 1.7.1.2.). Treba paziti da se gubitak vode svede na najmanju moguću mjeru i da se omogući izmjena plinova za vrijeme ispitivanja (npr. ispitne se posude mogu prekriti perforiranom polietilenskom folijom). Ako se ispituju hlapljive tvari, treba koristiti plinonepropusne posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Njihova veličina treba biti takva da uzorak tla ispuni približno jednu četvrtinu njihove zapremnine.

Za određivanje disanja induciranoga glukozom potrebni su inkubacijski sustavi i instrumenti za mjerenje proizvodnje ugljikovog dioksida ili potrošnje kisika. Primjeri takvih sustava i instrumenata mogu se pronaći u literaturi (8)(9)(10)(11).

1.6.2. **Odabir i broj tala**

Koristi se jedno tlo. Preporučena svojstva tla su:

— sadržaj pijeska: najmanje 50 % i najviše 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— sadržaj organskog ugljika: 0,5–1,5 %,

— treba izmjeriti mikrobnu biomasu (12)(13) i njezin sadržaj ugljika treba iznositi najmanje 1 % ukupnog organskog ugljika tla.

U većini slučajeva tlo s ovakvim svojstvima predstavlja najgori mogući slučaj, budući da je adsorpcija ispitivane kemikalije minimalna i njezina raspoloživost za mikrofloru maksimalna. Stoga općenito nisu potrebna ispitivanja s drugim tlima. Ipak, pod određenim okolnostima, npr. ako je predviđeno da se ispitivana tvar uglavnom koristi u određenim vrstama tla, kao što su kisela šumska tla, ili kod elektrostatički nabijenih kemikalija ponekad je potrebno upotrijebiti dodatno tlo.

1.6.3. **Skupljanje i skladištenje uzoraka tla**

1.6.3.1. *Skupljanje*

Trebaju biti raspoložive detaljne informacije o povijesti lokaliteta gdje se uzima tlo za ispitivanje. To uključuje točno mjesto, vegetacijski pokrov, datume tretiranja sredstvima za zaštitu bilja i organskim i anorganskim gnojivima, dodatke biološkog materijala i slučajna onečišćenja. Mjesto odabrano za uzimanje tla treba biti prikladno za dugotrajno korištenje. Prikladni su trajni pašnjaci, polja s godišnjim kulturama žitarica (osim kukuruza) ili gusto posijanom zelenom gnojidbom. Odabrano mjesto ne smije biti tretirano sredstvima za zaštitu bilja najmanje jednu godinu prije uzimanja uzorka. Osim toga, organska gnojiva ne smiju se primjenjivati najmanje šest mjeseci prije uzorkovanja. Uporaba mineralnih gnojiva prihvatljiva je samo ako je to u skladu sa zahtjevima kulture, a uzorci tla ne smiju se uzimati najmanje tri mjeseca nakon primjene gnojiva. Treba izbjegavati korištenje tla tretiranoga gnojivima s poznatim biocidnim učincima (npr. kalcijev cijanamid).

Treba izbjegavati uzorkovanje tijekom ili neposredno nakon dugih razdoblja suše (duže od 30 dana) ili poplave. Kod oranih tala uzorke treba uzeti na dubini od 0 do 20 cm. Kod travnatih površina (pašnjaka) i drugih tala koja se ne oru u dužim razdobljima (najmanje jedna sezona) maksimalna dubina uzorkovanja može biti malo veća od 20 cm (npr. do 25 cm). Uzorke tla treba prenositi u spremnicima u temperaturnim uvjetima koji jamče da se početna svojstva tla neće značajno promijeniti.

1.6.3.2. *Skladištenje*

Poželjno je koristiti tla koja su svježe skupljena na terenu. Ako se ne može izbjeći skladištenje u laboratoriju, tla se mogu skladištiti u mraku na 4 ± 2 °C najviše tri mjeseca. Za vrijeme skladištenja tla treba osigurati aerobne uvjete. Ako se uzorci tla uzimaju s površina koje su zamrznute najmanje tri mjeseca godišnje, može doći u obzir i skladištenje na minus 18 °C u trajanju od šest mjeseci. Mikrobna biomasa uskladištenih tala mjeri se prije svakog pokusa, a sadržaj ugljika u biomasi treba iznositi najmanje 1 % ukupnog sadržaja organskog ugljika tla (vidjeti odjeljak 1.6.2.).

▼B

1.6.4. **Rukovanje i priprema tla za ispitivanje**

1.6.4.1. *Predinkubacija*

Ako je tlo bilo uskladišteno (vidjeti odjeljak 1.6.3.2. i 1.7.1.3.), preporučuje se predinkubacija u trajanju između 2 i 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage tla tijekom predinkubacije trebaju biti slični temperaturi i sadržaju vlage kod ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.6.4.2. i 1.7.1.3.).

1.6.4.2. *Fizikalno-kemijska svojstva*

Tlo se ručno očisti od krupnih predmeta (npr. kamenje, dijelovi biljaka itd.) i zatim se vlažno prosije bez pretjeranog isušivanja na veličinu čestica do najviše 2 mm. Sadržaj vlage uzorka tla treba podesiti pomoću destilirane ili deionizirane vode na vrijednost između 40 % i 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta.

1.6.5. **Priprema ispitivane tvari za primjenu na tlo**

Ispitivana se tvar u pravilu primjenjuje pomoću nosača. Nosač može biti voda (kod tvari topljivih u vodi) ili inertna kruta tvar, kao što je sitni kremeni pijesak (veličina čestica: 0,1–0,5 mm). Treba izbjegavati sve tekuće nosače osim vode (npr. organska otapala kao što je aceton, kloroform) jer oni mogu oštetiti mikrofloru. Ako se kao nosač koristi pijesak, on se može obložiti ispitivanom tvari otopljenom ili suspendiranom u odgovarajućem otapalu. U tom slučaju otapalo treba ukloniti isparavanjem prije miješanja s tlom. Za optimalnu razdiobu ispitivane tvari u tlu preporučuje se omjer od 10 g pijeska po kilogramu tla (suhe mase). Kontrolni se uzorci obrađuju samo odgovarajućom količinom vode i/ili kremenog pijeska.

Kod ispitivanja hlapljivih kemikalija treba izbjegavati gubitke tijekom obrade te nastojati osigurati homogenu razdiobu u tlu (npr. ispitivanu tvar treba ubrizgati u tlo na nekoliko mjesta).

1.6.6. **Ispitne koncentracije**

Ako se ispituju sredstva za zaštitu bilja ili druge kemikalije s predvidivim koncentracijama u okolišu, treba koristiti najmanje dvije koncentracije. Niža koncentracija ne smije biti manja od očekivane maksimalne količine koja će dospjeti u tlo u stvarnim uvjetima primjene, dok viša koncentracija treba biti višekratnik niže koncentracije. Koncentracije ispitivane tvari koje se dodaju u tlo izračunavaju se uz pretpostavku jednolikog ulaganja do dubine od 5 cm i nasipne gustoće tla od 1,5. Kod agrokemikalija koje se izravno primjenjuju na tlo i kod kemikalija kod kojih se može predvidjeti količina koja će dospjeti u tlo preporučene ispitne koncentracije su maksimalna predvidiva koncentracija u okolišu (Predictable Environmental Concentraction, PEC) i njezina peterostruka vrijednost. Tvari kod kojih se očekuje više primjena u jednoj sezoni treba ispitati u koncentracijama koje se dobiju množenjem PEC-a maksimalnim očekivanim brojem primjena. Ipak, gornja koncentracija koja se ispituje smije biti najviše 10 puta veća od maksimalne količine jedne primjene.

Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, koristi se geometrijski niz od najmanje pet koncentracija. Ispitne koncentracije trebaju obuhvaćati područje potrebno za određivanje vrijednosti EC_x.

▼B

1.7. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.7.1. **Uvjeti izlaganja**

1.7.1.1. *Obrada i kontrola*

Ako se ispituju agrokemikalije, tlo se podijeli u tri dijela jednake mase. Dva se dijela pomiješaju s nosačem koji sadrži proizvod, a treći se pomiješa s nosačem bez proizvoda (kontrola). Preporučuju se najmanje po tri ponavljanja, kako kod obrađenog tako i kod neobrađenog tla. Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, tlo se podijeli u šest dijelova jednake mase. Pet se uzoraka pomiješa s nosačem koji sadrži ispitivanu tvar, a šesti se pomiješa s nosačem bez kemikalije. Preporučuju se po tri ponavljanja za obrađene uzorke i kontrolu. Treba paziti da se osigura homogena razdioba ispitivane tvari u obrađenim uzorcima tla. Kod miješanja treba izbjegavati zbijanje i grudanje tla.

1.7.1.2. *Inkubacija uzoraka tla*

Inkubacija uzoraka tla može se provesti na dva načina: u zbirnim uzorcima svakog obrađenog i neobrađenog tla ili kao niz pojedinačnih poduzoraka jednake veličine svakog obrađenog i neobrađenog tla. Ipak, ako se ispituju hlapljive tvari, ispitivanje se uvijek provodi s nizom pojedinačnih poduzoraka. Ako se tla inkubiraju zbirno, pripreme se velike količine svakog obrađenog i neobrađenog tla i tijekom ispitivanja uzimaju poduzorci za analizu prema potrebi. Početna količina koju treba pripremiti za sve obrade i kontrolu ovisi o veličini poduzoraka, broju ponavljanja koja se koriste u analizi i očekivanom maksimalnom broju uzorkovanja. Tla koja se inkubiraju zbirno treba dobro promiješati prije uzimanja poduzoraka. Ako se tla inkubiraju kao niz pojedinačnih uzoraka tla, svako se obrađeno i neobrađeno zbirno tlo podijeli u potreban broj poduzoraka, koji se koriste prema potrebi. Kod pokusa gdje se očekuje više od dva vremena uzorkovanja treba pripremiti dovoljno poduzoraka za sva ponavljanja i sva vremena uzorkovanja. Treba inkubirati najmanje tri paralelna uzorka ispitivanog tla u aerobnim uvjetima (vidjeti odjeljak 1.7.1.1.). Kod svih ispitivanja treba koristiti prikladne posude s dovoljno plinskog prostora kako ne bi nastali anaerobni uvjeti. Ako se ispituju hlapljive tvari, ispitivanje se uvijek provodi s nizom pojedinačnih poduzoraka.

1.7.1.3. *Ispitni uvjeti i trajanje*

Ispitivanje se provodi u mraku na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 C°. Sadržaj vlage u uzorcima tla za vrijeme ispitivanja treba održavati između 40 % i 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta tla (vidjeti odjeljak 1.6.4.2.) uz toleranciju od ± 5 %. Prema potrebi se može dodati destilirana ili deionizirana voda.

Ispitivanje traje najmanje 28 dana. Ako se ispituju agrokemikalije, usporede se količine oslobođenog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika u obrađenim i kontrolnim uzorcima. Ako se one 28. dana razlikuju za više od 25 %, ispitivanje se nastavlja dok se ne dobije razlika od 25 % ili manja ili najviše 100 dana, ovisno o tome što je kraće. Kod ostalih se kemikalija ispitivanje prekida nakon 28 dana. 28. dana se odrede količine oslobođenog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika u obrađenim i kontrolnim uzorcima tla i izračunaju vrijednosti EC_x.

▼B

1.7.2. **Uzorkovanje i analiziranje tala**

1.7.2.1. *Raspored uzorkovanja tla*

Ako se ispituju agrokemikalije, uzorci se tla analiziraju s obzirom na stope disanja induciranoga glukozom 0., 7., 14. i 28. dana. Ako je potrebno duže ispitivanje, daljnja mjerenja nakon 28. dana treba obavljati u razmacima od 14 dana.

Ako se ispituju kemikalije različite od agrokemikalija, koristi se najmanje pet ispitnih koncentracija i uzorci tla analiziraju se na disanje inducirano glukozom na početku (0. dan) i kraju razdoblja izlaganja (28 dana). Prema potrebi može se dodati i međumjerenje, npr. 7. dana. Podaci dobiveni 28. dana koriste se za određivanje vrijednosti EC_x kemikalije. Podaci kontrolnih uzoraka 0. dana mogu se, po želji, upotrijebiti za procjenu početnih količina metabolički aktivne mikrobne biomase u tlu (12).

1.7.2.2. *Mjerenje stopa disanja induciranoga glukozom*

Stopa disanja induciranoga glukozom određuje se u svakom vremenu uzorkovanja u svim obrađenim i kontrolnim uzorcima. Uzorci tla pomiješaju se s dovoljnom količinom glukoze da se trenutačno postigne maksimalni respiratorni odgovor. Količina glukoze potrebna da se postigne maksimalni respiratorni odgovor pojedinog tla može se odrediti u preliminarnom ispitivanju s nizom koncentracija glukoze (14). Ipak, kod pjeskovitih tala s 0,5–1,5 % organskog ugljika obično je dovoljno 2 000 mg do 4 000 mg glukoze po kg suhe mase tla. Glukoza se može samljeti u prah s čistim kremenim pijeskom (10 g pijeska/kg suhe mase tla) i homogeno pomiješati s tlom.

Uzorci tla obogaćeni glukozom inkubiraju se na 20 ± 2 °C u prikladnoj aparaturi u kojoj se stope disanja mjere neprekidno, svakog sata ili svaka dva sata (vidjeti odjeljak 1.6.1.). Oslobođeni ugljikov dioksid odnosno potrošeni kisik mjeri se tijekom 12 uzastopnih sati; mjerenja treba započeti što prije tj. u roku jednog do dva sata nakon dodavanja glukoze. Izmjere se ukupne količine ugljikovog dioksida koji je oslobođen ili kisika koji je potrošen tijekom 12 sati i odrede srednje stope disanja.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Kod ispitivanja s agrokemikalijama treba zabilježiti količinu oslobođenog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika za svaki uzorak tla i u tabličnom obliku navesti srednje vrijednosti svih ponavljanja. Rezultate treba vrednovati odgovarajućim opće prihvatljivim statističkim metodama (npr. F test, razina značajnosti 5 %). Stope disanja induciranoga glukozom izražavaju se u mg ugljikovog dioksida/kg suhe mase tla/h odnosno mg kisika/suha masa tla/h. Srednja stopa tvorbe ugljikovog dioksida odnosno srednja stopa potrošnje kisika u svakoj obradi usporedi se s kontrolom i izračuna se postotak odstupanja od kontrolne vrijednosti.

▼B

Ako se ispitivanja provode s kemikalijama različitim od agrokemikalija, odrede se količine oslobođenog ugljikovog dioksida odnosno potrošenog kisika u svakom ponavljanju i izradi krivulja doza-odgovor za procjenu vrijednosti EC_x. Stope disanja induciranoga glukozom (tj. mg ugljikovog dioksida/kg suhe mase tla/h odnosno mg kisika/suha masa tla/h) utvrđene u obrađenim uzorcima nakon 28 dana usporede se s kontrolom. Iz tih se podataka izračunaju postoci inhibicije za svaku ispitnu koncentraciju. Ti se postoci grafički prikažu u ovisnosti o koncentraciji i primijene se statistički postupci za izračun vrijednosti EC_x. Granice pouzdanosti ($p = 0,95$) za izračunani EC_x također se određuju primjenom standardnih postupaka (15)(16)(17).

2.2. TUMAČENJE REZULTATA

Ako se kod vrednovanja rezultata ispitivanja s agrokemikalijama pokaže da je u bilo kojem vremenu uzorkovanja nakon 28. dana razlika u stopama disanja između niže obrade (tj. maksimalne predviđene koncentracije) i kontrole jednaka ili manja od 25 %, može se ocijeniti da proizvod nema dugotrajni utjecaj na pretvorbu ugljika u tlu. Kad se vrednuju rezultati ispitivanja s drugim kemikalijama koriste se vrijednosti EC_{50}, EC_{25} i/ili EC_{10}.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

potpuni podaci o upotrijebljenom tlu, uključujući:

— geografske koordinate lokaliteta (širina, dužina),

— informacije o povijesti lokaliteta (npr. vegetacijski pokrov, tretiranje sredstvima za zaštitu bilja, tretiranje gnojivima, slučajno onečišćenje itd.),

— način korištenja (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd.),

— dubinu uzorkovanja (cm),

— sadržaj pijeska/praha/gline (% suhe mase),

— pH (u vodi),

— sadržaj organskog ugljika (% suhe mase),

— sadržaj dušika (% suhe mase),

— kapacitet izmjene kationa (mmol/kg),

— početnu mikrobnu biomasu u postotku ukupnog organskog ugljika,

— uputu na metode korištene za određivanje pojedinih parametara,

— sve informacije vezane uz skupljanje i skladištenje uzoraka tla,

— podatke o predinkubaciji tla (prema potrebi).

▼B

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i, prema potrebi, fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije, uključujući, prema potrebi, strukturnu formulu, čistoću (kod sredstava za zaštitu bilja postotak aktivne tvari), sadržaj dušika.

Uvjeti ispitivanja:

— podaci o obogaćivanju tla organskim supstratom,

— broj koncentracija ispitivane tvari i, prema potrebi, obrazloženje odabranih koncentracija,

— podaci o primjeni ispitivane tvari na tlo,

— temperatura inkubacije,

— sadržaj vlage u tlu na početku i za vrijeme ispitivanja,

— metoda inkubacije tla (tj. zbirni uzorak ili niz pojedinačnih poduzoraka),

— broj ponavljanja,

— vremena uzorkovanja.

Rezultati:

— metoda i oprema koja se koristi za mjerenje stopa disanja,

— tablični podaci, uključujući pojedinačne i srednje vrijednosti količina ugljikovog dioksida odnosno kisika,

— odstupanje između ponavljanja kod obrađenih i kontrolnih uzoraka,

— obrazloženje korekcija izračuna, prema potrebi,

— postotak odstupanja stopa disanja induciranoga glukozom u svakom vremenu uzorkovanja odnosno, prema potrebi, EC_{50} s granicom pouzdanosti 95 %, drugi EC_x (tj. EC_{25} ili EC_{10}) s intervalima pouzdanosti i graf krivulje doza-odgovor,

— statistička obrada rezultata, prema potrebi,

— sve informacije i zapažanja korisna za tumačenje rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA, (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6, (1993) Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E., (1987) Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E., (1982) Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

(9) ISO 11266-1, (1993) Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239, (1997E) Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G., (1989) Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P., (1986) Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROBNA I ANAEROBNA PRETVORBA U TLU

1. METODA

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD TG 307 (2002)

1.1. UVOD

Ova se ispitna metoda temelji na postojećim smjernicama (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Postupak opisan u ovoj ispitnoj metodi namijenjen je ocjenjivanju aerobne i anaerobne pretvorbe kemikalija u tlu. Pokusi se izvode u svrhu određivanja i. brzine pretvorbe ispitivane tvari te ii. vrste i brzine tvorbe i razgradnje proizvoda pretvorbe kojima mogu biti izložene biljke i organizmi koji žive u tlu. Ova su istraživanja potrebna kod kemikalija koje se izravno primjenjuju na tlo i kemikalija koje mogu dospjeti u zemni okoliš. Rezultati tih laboratorijskih istraživanja mogu se koristiti i za izradu protokola uzorkovanja i analize za srodna terenska istraživanja.

Za ocjenjivanje puteva pretvorbe (8)(10)(11) uglavnom su dovoljna aerobna i anaerobna istraživanja s jednom vrstom tla. Brzine pretvorbe treba odrediti u još najmanje tri tla. (8)(10).

Na radionici OECD-a o odabiru tala i sedimenata održanoj u talijanskom Belgiratu 1995. (10) posebno su dogovoreni broj i vrste tla koja će se koristiti u ovom testu. Vrste tla koje se ispituju trebaju biti reprezentativne za uvjete okoliša u kojima će se tvar koristiti odnosno ispuštati. Primjerice, kemikalije koje bi se mogle ispuštati u suptropskim do tropskim klimama treba ispitivati s ferasolima ili nitosolima (sustav FAO). Na radionici su također dane preporuke u vezi sa skupljanjem, rukovanjem i skladištenjem uzoraka tla na temelju smjernice ISO (15). Ova metoda također uzima u obzir uporabu tala rižišta.

1.2. DEFINICIJE

Ispitivana tvar: bilo koja tvar, bilo polazni spoj ili relevantni proizvodi pretvorbe.

Proizvodi pretvorbe: sve tvari koje nastaju u biotičkim ili abiotičkim reakcijama pretvorbe ispitivane tvari, uključujući CO_2 i proizvode u vezanim ostacima.

Vezani ostaci: „vezani ostaci” predstavljaju spojeve u tlu, biljki ili životinji koji nakon ekstrakcije ostaju u matrici u obliku polazne tvari ili njezinog/ih metabolita/proizvoda pretvorbe. Metoda ekstrakcije ne smije znatno promijeniti same spojeve niti strukturu matrice. Vrsta veze može se djelomično razjasniti ekstrakcijskim metodama koje mijenjaju matricu i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Do sada su na taj način utvrđene npr. kovalentne ionske i sorpcijske veze te uklapanja. Općenito, tvorba vezanih ostataka značajno smanjuje biodostupnost i bioraspoloživost (12) [prilagođeno na temelju IUPAC 1984 (13)].

Aerobna pretvorba: reakcije koje se odvijaju u prisutnosti molekularnog kisika (14).

▼B

Anaerobna pretvorba: reakcije koje se odvijaju bez pristupa molekularnog kisika (14).

Tlo: mješavina mineralnih sastojaka i organsko-kemijskih sastojaka koji sadrže spojeve velike molekulske mase s visokim sadržajem ugljika i dušika, oživljena sitnim (uglavnom mikro) organizmima. Tlom se može rukovati u dva stanja:

(a) neporemećeno: onako kako je nastalo s vremenom, s karakterističnim slojevima različitih vrsta tla;

(b) poremećeno: kakvo se obično nalazi na poljoprivrednim zemljištima odnosno kakvo je u ovoj metodi prisutno u uzorcima koji se uzimaju kopanjem (14).

Mineralizacija: potpuna razgradnja organskog spoja u CO_2 i H_2O u aerobnim uvjetima i CH_4, CO_2 i H_2O u anaerobnim uvjetima. Ako se u kontekstu ove ispitne metode koristi ^{14}C obilježeni spoj, mineralizacija znači opsežnu razgradnju tijekom koje obilježeni atom ugljika oksidira uz otpuštanje odgovarajuće količine $^{14}CO_2$ (14).

Vrijeme poluraspada: $t_{0,5}$ je vrijeme koje je potrebno za 50 %-tnu pretvorbu ispitivane tvari, ako se pretvorba može opisati kinetikom prvog reda; ono je neovisno o koncentraciji.

DT_{50} (vrijeme nestajanja 50): vrijeme u kojemu se koncentracija ispitivane tvari smanji za 50 %; ono se razlikuje od vremena poluraspada $t_{0,5}$ ako pretvorba ne prati kinetiku prvog reda.

DT_{75} (vrijeme nestajanja 75): vrijeme u kojemu se koncentracija ispitivane tvari smanji za 75 %.

DT_{90} (vrijeme nestajanja 90): vrijeme u kojemu se koncentracija ispitivane tvari smanji za 90 %.

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari treba koristiti za opisivanje i/ili identificiranje proizvoda pretvorbe spektroskopskim i kromatografskim metodama.

1.4. PRIMJENJIVOST TESTA

Metoda se može primijeniti na sve kemikalije (neobilježene i radioaktivno obilježene) za koje je raspoloživa dovoljno točna i osjetljiva analitička metoda. Ona se može primijeniti na blago hlapljive i nehlapljive spojeve kao i na vodotopljive spojeve i spojeve netopljive u vodi. Test ne treba primjenjivati u slučaju kemikalija koje su jako hlapljive iz tla (npr. fumiganti, organska otapala) te se stoga ne mogu zadržati u tlu u pokusnim uvjetima ovog testa.

▼B

1.5. INFORMACIJE O TVARI

Za mjerenje brzine pretvorbe mogu se koristiti neobilježene i obilježene ispitivane tvari. Za proučavanje puta pretvorbe i utvrđivanje bilance mase potreban je obilježeni materijal. Preporučuje se ^{14}C obilježavanje, ali korisna je i primjena drugih izotopa, kao što su ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Ako je to moguće, oznaku treba staviti na najstabilni dio odnosno dijelove molekule ([1]). Čistoća ispitivane tvari treba biti najmanje 95 %.

Prije provedbe testa aerobne i anaerobne pretvorbe u tlu trebaju biti raspoložive sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) topljivost u vodi (metoda A.6.)

(b) topljivost u organskim otapalima;

(c) tlak pare (metoda A.4.) i konstanta Henryjevog zakona;

(d) podjelni koeficijent n-oktanol/voda (metoda A.8.);

(e) kemijska stabilnost u mraku (hidroliza) (metoda C.7.);

(f) pK_a, ako je molekula sklona protonaciji ili deprotonaciji [smjernica OECD 112] (16).

Osim toga, korisno je imati podatke o toksičnosti ispitivane tvari za mikroorganizme koji žive u tlu [ispitne metode C.21. i C 22.] (16).

Trebaju biti raspoložive analitičke metode (uključujući metodu ekstrakcije i pročišćavanja) za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivane tvari i njezinih proizvoda pretvorbe.

1.6. NAČELO ISPITNE METODE

Uzorci tla se obrade ispitivanom tvari i inkubiraju u mraku u tikvicama biometarskog tipa ili protočnim sustavima u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (stalna temperatura i vlažnost tla). Uzorci tla se u odgovarajućim vremenskim razmacima ekstrahiraju i analiziraju na polaznu tvar i proizvode pretvorbe. Hlapljivi se proizvodi također skupljaju za analizu pomoću odgovarajućih apsorpcijskih uređaja. Primjenom ^{14}C obilježenog materijala mogu se izmjeriti različite brzine mineralizacije ispitivane tvari odvajanjem razvijenog $^{14}CO_2$ i utvrditi bilanca mase, uključujući tvorbu vezanih ostataka u tlu.

1.7. KRITERIJI KAKVOĆE

1.7.1. **Iskorištenje**

Prve naznake ponovljivosti analitičke metode i uspješnosti jednolike primjene ispitivane tvari mogu se dobiti ekstrakcijom i analizom najmanje dva paralelna uzorka tla neposredno nakon dodavanja ispitivane tvari. Iskorištenja u kasnijim fazama pokusa proizlaze iz odgovarajućih bilanci mase. Iskorištenje se treba kretati u području od 90 % do 110 % kod obilježenih kemikalija (8) i od 70 % do 110 % kod neobilježenih kemikalija (3).

([1]) Primjerice, ako ispitivana tvar sadrži jedan prsten, oznaka se mora staviti na taj prsten; ako ispitivana tvar sadrži dva ili više prstenova, ponekad je potrebno provesti posebna istraživanja kako bi se ocijenila sudbina svakog obilježenog prstena i dobile potrebne informacije o nastajanju proizvoda pretvorbe.

▼B

1.7.2. **Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode (bez početne učinkovitosti ekstrakcije) kod kvantifikacije ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe može se provjeriti dvostrukom analizom istog ekstrakta tla koje je inkubirano dovoljno dugo da nastanu proizvodi pretvorbe.

Granica detekcije (limit of detection, LOD) analitičke metode za ispitivanu tvar i proizvode pretvorbe treba biti najmanje 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ tla (kao ispitivana tvar) ili 1 % primijenjene doze, ovisno o tome što je manje. Također je potrebno navesti granicu kvantifikacije (limit of quantification, LOQ).

1.7.3. **Točnost podataka o pretvorbi**

Regresijska analiza koncentracija ispitivane tvari kao funkcije vremena daje odgovarajuće informacije o pouzdanosti krivulje pretvorbe i omogućuje izračun granica pouzdanosti za vremena polurazpada (u slučaju kinetike pseudoprvog reda) odnosno vrijednosti DT_{50} i, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90}.

1.8. OPIS METODE

1.8.1. **Oprema i kemijski reagensi**

Inkubacijski sustavi se sastoje od statičkih zatvorenih sustava ili prikladnih protočnih sustava (7)(17). Primjeri prikladne protočne aparature za inkubaciju tla i tikvice biometarskog tipa prikazani su na slici 1. i 2. Obje vrste inkubacijskih sustava imaju prednosti i ograničenja (7)(17).

Potrebna je standardna laboratorijska oprema, posebno:

— analitički instrumenti, kao što su oprema za GLC, HPLC, TLC, uključujući odgovarajuće detekcijske sustave za analiziranje radioaktivno obilježenih i neobilježenih tvari ili inverznu metodu razrjeđenja izotopa,

— instrumenti za potrebe identifikacije (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd.),

— tekućinski scintilacijski brojač,

— oksidator za izgaranje radioakivnog materijala,

— centrifuga,

— aparatura za ekstrakciju (npr. epruvete za centrifugiranje za hladnu ekstrakciju i aparatura po Soxhletu za kontinuiranu ekstrakciju pod refluksom),

— instrumenti za koncentriranje otopina i ekstrakata (npr. rotacijski isparivač),

— vodena kupelj,

— mehanički uređaj za miješanje (npr. uređaj za gnjetenje, rotacijska mješalica).

▼B

Kemijski reagensi koji se koriste su npr.:

— NaOH, analitički čist, 2 mol· dm^{-3} ili druga odgovarajuća baza (npr. KOH, etanolamin),

— H_2SO_4, analitički čista, 0,05 mol· dm^{-3},

— etilen-glikol, analitički čist,

— kruti apsorpcijski materijali, kao što je natronsko vapno i poliuretanski čepovi.

— organska otapala, analitički čista, kao što je aceton, metanol itd.,

— scintilacijska tekućina.

1.8.2. **Primjena ispitivane tvari**

Da bi se olakšalo uvođenje ispitivane tvari u tlo i njezina razdioba u tlu, ispitivana tvar se može otopiti u vodi (deionizirana ili destilirana) ili, prema potrebi, u minimalnoj količini acetona ili drugog organskog otapala (6) u kojemu je ispitivana tvar dovoljno topljiva i stabilna. Ipak, količina odabranog otapala ne smije imati značajan utjecaj na mikrobnu aktivnost tla (vidjeti odjeljak 1.5. i 1.9.2. – 1.9.3.). Treba izbjegavati uporabu otapala koja inhibiraju mikrobnu aktivnost, kao što je kloroform, diklormetan i druga halogenirana otapala.

Ispitivana tvar se može dodati i u krutom stanju npr. umiješana u kremeni pijesak (6) ili u malom poduzorku ispitivanog tla koji je prethodno osušen na zraku i steriliziran. Ako se ispitivana tvar dodaje uz pomoć otapala, otapalo treba pustiti da ispari prije dodavanja obrađenog poduzorka izvornom nesterilnom uzorku tla.

U slučaju kemikalija u općoj uporabi čiji su glavni putevi ulaska u tlo kanalizacijski mulj/primjena u poljoprivredi, ispitivanu tvar treba prvo dodati u mulj i zatim mulj uvesti u uzorak tla (vidjeti odjeljak 1.9.2. i 1.9.3.).

U pravilu se ne preporučuje uporaba formuliranih proizvoda. Ipak, uporaba formuliranog materijala može biti prikladna alternativa npr. kod slabo topljivih ispitivanih tvari.

1.8.3. **Tla**

1.8.1.3. *Odabir tla*

Za određivanje puta pretvorbe treba koristiti reprezentativno tlo; preporučuje se pjeskovita ilovača ili praškasta ilovača ili ilovača ili ilovasti pijesak (prema klasifikaciji FAO i USDA (18)) s pH 5,5 – 8,0, sadržajem organskog ugljika 0,5 – 2,5 % i mikrobnom biomasom od najmanje 1 % ukupnog organskog ugljika (10).

Kod istraživanja brzine pretvorbe treba koristiti još najmanje tri tla koja predstavljaju područje relevantnih tala. Tla trebaju imati različiti sadržaj organskog ugljika, pH, sadržaj gline i mikrobnu biomasu (10).

▼B

Sva tla treba opisati barem s obzirom na teksturu (% pijeska, % praha, % gline) [prema klasifikaciji FAO i USDA (18)], pH, kapacitet izmjene kationa, organski ugljik, nasipnu gustoću, svojstvo zadržavanja vode ([1]) i mikrobnu biomasu (samo kod aerobnih istraživanja). Za tumačenje rezultata mogu biti korisne i druge informacije o svojstvima tla. Za određivanje svojstava tla mogu se koristiti metode preporučene u literaturi (19)(20)(21)(22)(23). Mikrobna biomasa se može odrediti metodom disanja induciranog supstratom (substrate-induced respiration, SIR) (25)(26) ili alternativnim metodama (20).

1.8.3.2. *Skupljanje, rukovanje i skladištenje tala*

Trebaju biti raspoložive detaljne informacije o povijesti lokaliteta gdje se uzima tlo za ispitivanje. To uključuje točno mjesto, vegetacijski pokrov, tretiranja kemikalijama, tretiranja organskim i anorganskim gnojivima, dodatke biološkog materijala i druga onečišćenja. Tla koja su u prethodne četiri godine tretirana ispitivanom tvari ili njezinim strukturnim analozima ne smiju se koristiti u istraživanjima pretvorbe (10)(15).

Treba uzeti svježe tlo s polja (iz horizonta A ili gornjeg sloja od 20 cm) čiji je sadržaj vode povoljan za prosijavanje. Treba izbjegavati uzimanje uzoraka tijekom ili neposredno nakon dugih razdoblja (> 30 dana) suše, smrzavanja ili poplave (14), osim u slučaju tala s rižišta. Uzorke tla treba prenositi tako da promjene sadržaja vode budu što manje i treba ih po mogućnosti držati u mraku uz slobodan pristup zraka. Za to je općenito prikladna labavo povezana polietilenska vreća.

Tlo treba obraditi što prije nakon uzorkovanja. Prije prosijavanja tla kroz 2-milimetarsko sito koje uklanja sitno kamenje, faunu i biljne ostatke treba ukloniti vegetaciju, krupniju faunu i kamenje. Treba izbjegavati pretjerano isušivanje i drobljenje tla prije prosijavanja (15).

Ako je zimi otežano uzorkovanje na terenu (tlo zamrznuto ili prekriveno slojevima snijega), uzorak se može uzeti iz tla pohranjenog u stakleniku ispod biljnog pokrova (npr. trava ili mješavina trave i djeteline). Prednost se u svakom slučaju daje tlima koja su svježe uzeta na terenu, ali ako se već skupljeno i obrađeno tlo mora uskladištiti prije početka istraživanja, treba osigurati prikladne uvjete i ograničiti vrijeme skladištenja (4 ± 2 °C najduže tri mjeseca) kako bi se održala mikrobna aktivnost ([2]). Detaljne upute za skupljanje, rukovanje i skladištenje tala koja se koriste u pokusima biološke pretvorbe mogu se naći u (8)(10 (15)(26)(27).

([1]) Svojstvo zadržavanja vode tla može se mjeriti kao poljski kapacitet, kao vodni kapacitet ili kao napon vlažnosti (pF). Za objašnjenje vidjeti Dodatak 1. U izvješću o ispitivanju treba navesti jesu li svojstvo zadržavanja vode i nasipna gustoća tala određeni na neporemećenim uzrocima s polja ili na poremećenim (obrađenim) uzorcima.

([2]) Noviji rezultati istraživanja pokazuju da se tla iz umjerenih zona mogu skladištiti na – 20 °C i duže od tri mjeseca (28) (29) bez značajnih gubitaka mikrobne aktivnosti.

▼B

Obrađeno tlo treba prije uporabe u ovom testu predinkubirati kako bi se omogućilo klijanje i uklanjanje sjemenja te kako bi se povratila ravnoteža mikrobnog metabolizma nakon prelaska s uvjeta uzorkovanja odnosno skladištenja na uvjete inkubacije. Uglavnom je dovoljno razdoblje predinkubacije između 2 i 28 dana u uvjetima temperature i vlage koji približno odgovaraju ispitnim uvjetima (15). Ukupno vrijeme skladištenja i predinkubacije zajedno ne smije biti duže od tri mjeseca.

1.9. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.9.1. **Ispitni uvjeti**

1.9.1.1. *Ispitna temperatura*

Tijekom cjelokupnog razdoblja ispitivanja tla treba inkubirati u mraku na stalnoj temperaturi koja je reprezentativna za klimatske uvjete u kojima će se tvar koristiti odnosno ispuštati. Za sve ispitivane tvari koje mogu dospjeti u tlo u umjerenim klimama preporučuje se temperatura od 20 ± 2 °C. Temperaturu treba nadzirati.

Kod kemikalija koje se primjenjuju ili ispuštaju u hladnijim klimama (npr. u sjevernim krajevima, u jesenskom/zimskom razdoblju) treba inkubirati dodatne uzorke tla, ali na nižoj temperaturi (npr. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Sadržaj vlage*

Kod testova pretvorbe u aerobnim uvjetima sadržaj vlage u tlu ([1]) treba podesiti i održavati na pF između 2,0 i 2,5 (3). Sadržaj vlage u tlu izražava se kao masa vode po masi suhog tla; sadržaj vlage treba redovito kontrolirati (npr. u razmacima od 2 tjedna) vaganjem inkubacijskih tikvica i gubitke vode nadoknaditi dodavanjem vode (po mogućnosti sterilno filtrirana voda iz slavine). Kod dodavanja vlage treba paziti da se gubici ispitivane tvari i/ili proizvoda pretvorbe ishlapljivanjem i/ili eventualnom fotokemijskom razgradnjom izbjegnu odnosno svedu na najmanju moguću mjeru.

Kod testova pretvorbe u anaerobnim uvjetima i uvjetima rižinog polja tlo treba zasititi vodom plavljenjem.

1.9.1.3. *Aerobni uvjeti inkubacije*

U protočnim se sustavima aerobni uvjeti održavaju periodičnim ispiranjem ili neprekidnim zračenjem vlažnim zrakom. U biometarskim tikvicama osigurana je izmjena zraka difuzijom.

1.9.1.4. *Sterilni aerobni uvjeti*

Da bi se dobile informacije o relevantnosti abiotičke pretvorbe ispitivane tvari, uzorci tla se mogu sterilizirati (za metode sterilizacije vidjeti (16) i (29)), obraditi sterilnom ispitivanom tvari (npr. dodavanje otopine kroz sterilni filtar) i dozračivati vlažnim sterilnim zrakom, kako je opisano u odjeljku 1.9.1.3. U slučaju tala rižišta, tlo i vodu treba sterilizirati i provesti inkubaciju kako je opisano u odjeljku 1.9.1.6.

([1]) Tlo ne smije biti premokro niti presuho kako bi se osiguralo dostatno dozračivanje i hranjenje mikroflore. Preporučeni sadržaj vlage za optimalni mikrobni rast kreće se u području od 40 – 60 % vodnog kapaciteta (WHC) i od 0,1 – 0,33 bar (6). Ovo posljednje područje istovjetno je području pF 2,0 – 2,5. Tipični sadržaji vlage za različite vrste tla navedeni su u Dodatku 2.

▼B

1.9.1.5. *Anaerobni uvjeti inkubacije*

Da bi se uspostavili i održali anaerobni uvjeti, tlo obrađeno ispitivanom tvari i inkubirano u aerobnim uvjetima u trajanju od 30 dana ili jednom vremenu poluraspada ili DT_{50} (ovisno o tome što je kraće) se preplavi vodom (sloj vode 1 – 3 cm) i inkubacijski sustav ispire inertnim plinom (npr. dušik ili argon) ([1]). Ispitni sustav mora omogućavati mjerenja npr. pH, koncentracije kisika i redoks potencijala i biti opremljen uređajima za odvajanje hlapljivih proizvoda. Biometarski sustav mora biti zatvoren kako bi se spriječio ulazak zraka difuzijom.

1.9.1.6. *Inkubacija u uvjetima rižinog polja*

Kod istraživanja pretvorbe tvari u tlima rižišta tlo se naplavi slojem vode od oko 1 – 5 cm i ispitivana tvar primijeni na vodenu fazu (9). Preporučuje se dubina tla od najmanje 5 cm. Sustav se prozračuje zrakom kao u aerobnim uvjetima. Treba pratiti i dokumentirati pH, koncentraciju kisika i redoks potencijal vodenog sloja. Prije početka istraživanja pretvorbe potrebno je razdoblje preinkubacije od najmanje dva tjedna (vidjeti odjeljak 1.8.3.2.).

1.9.1.7. *Trajanje ispitivanja*

Istraživanje brzine i puta pretvorbe u pravilu ne bi trebalo trajati duže od 120 dana ([2]) (3)(6)(8), budući da se nakon tog može očekivati postupno smanjenje mikrobne aktivnosti tla u umjetnom laboratorijskom sustavu odsječenom od prirodnih procesa obnavljanja. Istraživanje može trajati i duže (npr. 6 ili 12 mjeseci), ako je to potrebno za opisivanje razgradnje ispitivane tvari i tvorbe i razgradnje glavnih proizvoda pretvorbe (8). Duža razdoblja inkubacije treba obrazložiti u izvješću o ispitivanju i navesti mjerenja biomase za vrijeme i na kraju tih razdoblja.

1.9.2. **Provođenje ispitivanja**

U svaku se inkubacijsku tikvicu stavi oko 50 do 200 g tla (na bazi suhe mase) (vidjeti sliku 1. i 2. u Dodatku 3.) i tlo obradi ispitivanom tvari jednom od metoda opisanih u odjeljku 1.8.2. Ako se za primjenu ispitivane tvari koriste organska otapala, njih treba ukloniti iz tla isparavanjem. Tlo se zatim dobro promiješa spatulom i/ili tresenjem tikvice. Ako se istraživanje provodi u uvjetima rižinog polja, tlo i vodu treba temeljito promiješati nakon primjene ispitivane tvari. Male alikvote obrađenog tla (npr. 1 g) treba analizirati na ispitivanu tvar radi provjere jednolike razdiobe tvari. Za alternativnu metodu vidjeti dolje.

([1]) Aerobni uvjeti vladaju u površinskim tlima, pa čak i u dubljim slojevima tla, kako je pokazao istraživački projekt pod pokroviteljstvom EU-a [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Anaerobni uvjeti se javljaju tek povremeno kod plavljenja tla nakon obilnih kiša ili kad se u rižištu uspostave uvjeti rižinog polja.

([2]) Aerobna se istraživanja mogu prekinuti znatno prije 120. dana pod uvjetom da je jasno utvrđen konačni put pretvorbe i potpuna mineralizacija. Ispitivanje se može prekinuti nakon 120 dana, ili kad se postigne pretvorba najmanje 90 % ispitivane tvari, ali samo ako je stvoreno najmanje 5 % CO_2.

▼B

Ispitna koncentracija treba odgovarati maksimalnoj preporučenoj količini primjene sredstva za zaštitu bilja iz uputa za uporabu i ravnomjernom ulaganju do odgovarajuće dubine u polju (npr. gornji sloj od 10 cm) ([1]). Primjerice, u slučaju kemikalija koje se primjenjuju na lišće ili tlo bez ulaganja, primjerena dubina za izračun količine kemikalije koju treba dodati u tikvicu je 2,5 cm. Primjerena dubina za kemikalije koje se ulažu u tlo je dubina ulaganja navedena u uputama za uporabu. Kod kemikalija u općoj uporabi količinu primjene treba procijeniti na temelju najrelevantijeg puta unosa; primjerice, ako je glavni put unosa u tlo kanalizacijski mulj, kemikaliju treba dozirati u mulj u koncentraciji koja odgovara očekivanoj koncentraciji u mulju, a količina mulja dodana u tlo treba odgovarati uobičajenoj količini mulja u poljoprivrednim zemljištima. Ako ova koncentracija nije dovoljno visoka za identifikaciju glavnih proizvoda pretvorbe, ponekad je korisno inkubirati zasebne uzorke tla koji sadrže veće količine, ali treba izbjegavati pretjerane količine koje utječu na mikrobne funkcije tla (vidjeti odjeljak 1.5. i 1.8.2.).

Druga je mogućnost da se veća šarža tla (tj. 1 do 2 kg) obradi ispitivanom tvari, pažljivo promiješa u odgovarajućoj mješalici, podijeli u male dijelove od 50 do 200 g i prenese u inkubacijske tikvice (primjerice uz pomoć razdjeljivača uzoraka). Male alikvote obrađenog tla (npr. 1 g) treba analizirati na ispitivanu tvar radi provjere jednolike razdiobe tvari. Ovom se postupku daje prednost budući da omogućuje ravnomjerniju razdiobu ispitivane tvari u tlu.

Neobrađene uzorke tla treba inkubirati u istim uvjetima (aerobni) kao uzorke obrađene ispitivanom tvari. Ti se uzorci koriste za mjerenja biomase tijekom i na kraju istraživanja.

Ako se ispitivana tvar primjenjuje na tlo otopljena u organskom otapalu odnosno otapalima, uzorci tla obrađeni istom količinom otapala inkubiraju se u istim uvjetima (aerobni) kao uzorci obrađeni ispitivanom tvari. Ti se uzorci koriste za mjerenja biomase na početku, tijekom i na kraju istraživanja radi provjere učinaka otapala na mikrobnu biomasu.

Tikvice koje sadrže obrađeno tlo se priključuju na protočni sustav opisan na slici 1. ili se zatvore apsorpcijskom kolonom prikazanom na slici 2. (vidjeti Dodatak 3.).

([1]) Izračun početne koncentracije na bazi površine uz pomoć jednadžbe:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = početna koncentracija u tlu [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = količina primjene [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = debljina sloja tla u polju [m]; d = suha nasipna gustoća tla [$kg \cdot m^{-3}$]

Iskustveno pravilo kaže da količina primjene od 1 $kg \cdot ha^{-1}$ rezultira koncentracijom u tlu od približno 1 $mg \cdot kg^{-1}$ u sloju od 10 cm (uz pretpostavku nasipne gustoće od 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Uzorkovanje i mjerenje**

U odgovarajućim vremenskim razmacima vade se po dvije paralelne tikvice i uzorci tla ekstrahiraju odgovarajućim otapalima različitog polariteta i analiziraju na ispitivanu tvar i/ili proizvode pretvorbe. Dobar plan istraživanja predviđa dovoljan broj tikvica da se prilikom svakog uzorkovanja mogu žrtvovati po dvije tikvice. Osim toga, apsorpcijske otopine odnosno kruti apsorpcijski materijali se u različitim vremenskim razmacima (razmaci od 7 dana u prvom mjesecu, nakon prvog mjeseca u razmacima od 17 dana) tijekom inkubacije i na kraju inkubacije svakog uzorka tla uklanjaju i analiziraju na hlapljive proizvode. Uz uzorak tla koji se uzima neposredno nakon primjene (uzorak 0. dana) treba predvidjeti još najmanje pet vremena uzorkovanja. Vremenske razmake treba odabrati na način da se mogu utvrditi obrasci razgradnje ispitivane tvari i obrasci tvorbe i razgradnje proizvoda pretvorbe (npr. 0, 1, 3, 7 dana; 2, 3 tjedna, 1, 2, 3 mjeseca itd.).

Ako se koristi ^{14}C obilježena ispitivana tvar, neizlučljiva radioaktivnost se kvantificira izgaranjem i izračuna bilanca mase za svaki interval uzorkovanja.

U slučaju anaerobne inkubacije i inkubacije u uvjetima rižinog polja, faza tla i vodena faza se zajedno analiziraju na ispitivanu tvar i proizvode pretvorbe, ili se prije ekstrakcije i analize odvoje filtriranjem ili centrifugiranjem.

1.9.4. **Fakultativna ispitivanja**

Aerobna nesterilna istraživanja pri dodatnim temperaturama i vlažnostima tla mogu biti korisna za procjenu utjecaja temperature i vlažnosti tla na brzinu pretvorbe ispitivane tvari i/ili njezinih proizvoda pretvorbe u tlu.

Neizlučljiva radioaktivnost može se pokušati detaljnije opisati npr. putem ekstrakcije superkritičnim fluidima.

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Količine ispitivane tvari, proizvoda pretvorbe, hlapljivih tvari (samo u %) i neizlučljivih tvari treba navesti u % primijenjene početne koncentracije te, prema potrebi, u $mg \cdot kg^{-1}$ tla (na bazi suhe mase tla) za svaki interval uzorkovanja. Bilancu mase treba prikazati u postotku primijenjene početne koncentracije za svaki interval uzorkovanja. Grafički prikaz koncentracija ispitivane tvari u vremenu omogućit će procjenu vremena poluraspada pretvorbe odnosno DT_{50}. Potrebno je identificirati glavne proizvode pretvorbe i izraditi grafički prikaz njihovih koncentracija u ovisnosti o vremenu tako da bude vidljiva brzina njihove tvorbe i razgradnje. Glavni proizvod pretvorbe je bilo koji proizvod koji u bilo kojem trenutku tijekom istraživanja čini $\geq$ 10 % primijenjene doze.

Odvojeni hlapljivi proizvodi daju određeni uvid u potencijal hlapljivosti ispitivane tvari i njezinih proizvoda pretvorbe iz tla.

▼B

Točnije određivanje vremena poluraspada odnosno vrijednosti DT_{50} i, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90} trebalo bi se postići izračunima uz pomoć odgovarajućih kinetičkih modela. Vrijeme poluraspada i vrijednost DT_{50} treba navesti zajedno s opisom primijenjenog modela, redom kinetike i koeficijentom determinacije (r^2). Prednost se daje kinetici prvog reda, osim ako je $r^2 < 0,7$. Te izračune treba prema potrebi primijeniti i na glavne proizvode pretvorbe. Primjeri odgovarajućih modela opisani su u (31) do (35).

Ako se istraživanja za određivanje brzine provode na različitim temperaturama, brzine pretvorbe treba opisati kao funkciju temperature unutar temperaturnog područja pokusa primjenom Arrheniusovog odnosa u obliku:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ sau } \ln k = 1nA - \frac{B}{T}$$

gdje su ln A i B regresijske konstante odsječka odnosno nagiba najboljeg pravca dobivenog linearnom regresijom ln k prema 1/T, k je konstanta brzine na temperaturi T i T je temperatura u kelvinima. Ako je pretvorba uvjetovana mikrobnom aktivnošću, treba voditi računa o ograničenom temperaturnom području u kojemu vrijedi Arrheniusov odnos.

2.2. VREDNOVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

Iako se istraživanja provode u umjetnom laboratorijskom sustavu, rezultati omogućuju procjenu brzine pretvorbe ispitivane tvari te brzine tvorbe i razgradnje proizvoda pretvorbe u stvarnim uvjetima na terenu (36)(37).

Istraživanje puta pretvorbe ispitivane tvari pruža informacije o načinu na koji se primijenjena tvar strukturno mijenja u tlu kemijskim i mikrobnim reakcijama.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

Izvješće o ispitivanju mora sadržavati:

ispitivana tvar:

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (uz naznaku mjesta oznake odnosno oznaka ako se koristi radioaktivno obilježeni materijal) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— čistoća (nečistoće) ispitivane tvari,

— radiokemijska čistoća obilježene kemikalije i molarna aktivnost (prema potrebi).

Referentne tvari:

— kemijski naziv i struktura referentnih tvari koje se koriste za opisivanje i/ili identifikaciju proizvoda pretvorbe.

Ispitivana tla:

— podaci o mjestu skupljanja,

— datum i postupak uzorkovanja tla,

▼B

— svojstva tla, kao što je pH, sadržaj organskog ugljika, tekstura (% pijeska, % praha, % gline), kapacitet izmjene kationa, nasipna gustoća, svojstvo zadržavanja vode i mikrobna biomasa,

— vrijeme skladištenja tla i uvjeti skladištenja (ako se skladišti).

Ispitni uvjeti:

— datumi provedbe istraživanja,

— primijenjena količina ispitivane tvari,

— otapala i metoda primjene ispitivane tvari,

— masa tla koja je obrađena na početku istraživanja i koja je uzeta na analizu u svakom vremenu uzorkovanja,

— opis primijenjenog inkubacijskog sustava,

— brzine protoka zraka (samo kod protočnih sustava),

— pokusna temperatura,

— sadržaj vlage u tlu za vrijeme inkubacije,

— mikrobna biomasa na početku, za vrijeme i na kraju aerobnih istraživanja,

— pH, koncentracija kisika i redoks potencijal na početku, za vrijeme i na kraju anaerobnih istraživanja i istraživanja u uvjetima rižinog polja,

— metoda(-e) ekstrakcije,

— metode kvantifikacije i identifikacije ispitivane tvari i glavnih proizvoda pretvorbe u tlu i apsorpcijskim materijalima,

— broj ponavljanja i broj kontrola.

Rezultati:

— rezultat određivanja mikrobne aktivnosti,

— ponovljivost i osjetljivost primijenjenih analitičkih metoda,

— stope iskorištenja (postoci za valjano istraživanje navedeni su u odjeljku 1.7.1.),

— tablice rezultata izraženih u % primijenjene početne doze te, prema potrebi, u mg• kg^{-1} tla (na bazi suhe mase),

— bilanca mase za vrijeme i na kraju istraživanja,

— opis neizlučljive (vezane) radioaktivnosti odnosno ostataka u tlu,

— kvantifikacija oslobođenog CO_2 i drugih hlapljivih spojeva,

— grafički prikazi koncentracija u tlu u ovisnosti o vremenu za ispitivanu tvar i, prema potrebi, za glavne proizvode pretvorbe,

— vrijeme poluraspada odnosno DT_{50}, DT_{75} i DT_{90} za ispitivanu tvar i, prema potrebi, za glavne proizvode pretvorbe, uključujući granice pouzdanosti,

▼B

— procjena brzine abiotičke razgradnje u sterilnim uvjetima,

— ocjena kinetike pretvorbe za ispitivanu tvar i, prema potrebi, za glavne proizvode pretvorbe,

— predloženi putevi pretvorbe, prema potrebi.

— rasprava i tumačenje rezultata,

4. **REFERENCE**

(1) US – Environmental Protection Agency, (1982) Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Europska Unija (EU), (1995) Direktiva Komisije 95/36/EZ od 14. srpnja 1995. o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ o stavljanju na tržište proizvoda za zaštitu biljaka Prilog II., Dio A i Prilog III., Dio A: Opstanak i ponašanje u okolišu.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1995) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA, (1986) Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1, (1994) Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239, (1997) Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A., (1980) The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, str. 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993) Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Dodatak V. Direktivi 67/548/EEZ.

(17) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986) Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982) Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994) Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P., (1975) Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, str. 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997) Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E., (1987) Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998) Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, str. 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E., (1996) Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996) Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R., (1987) Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, str. 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, str. 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W., (1976) The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, str. 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W., (1975) Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., str. 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V., (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, str. 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H., (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, str. 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R., (1990) Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, str. 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A., (1980) Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, str. 83-122.

▼B

Dodatak 1.

VODNI TLAK, POLJSKI KAPACITET (FC) I VODNI KAPACITET (WHC) [1]

Visina vodenog stupca [cm]	pF [a]	bar [b]	Napomene
10^7	7	10^4	suho tlo
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	točka venuća
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	područje poljskog kapaciteta [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (aproksimacija)
1	0	0,001	tlo zasićeno vodom

[a] pF = log cm vodenog stupca.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Odgovara približnom sadržaju vode od 10 % u pijesku, 35 % u ilovači i 45 % u glini.
[d] Poljski kapacitet nije stalan i kreće se između pF 1,5 i 2,5 ovisno o vrsti tla.

Vodni tlak mjeri se u cm vodenog stupca ili barima. Zbog širokog raspona napona vlažnosti izražava se jednostavno kao vrijednost pF koja je istovjetna logaritmu cm vodenog stupca.

Poljski kapacitet definira se kao količina vode koju može pohraniti prirodno tlo protiv gravitacije dva dana nakon dužeg kišnog razdoblja ili nakon dostatnog navodnjavanja. Određuje se u neporemećenim tlima *in situ* u polju. Dakle, mjerenje nije primjenljivo u slučaju poremećenih laboratorijskih uzoraka tla. Vrijednosti FC određene u poremećenim tlima mogu pokazivati velike sustavne varijance.

Vodni kapacitet (WHC) određuje se u laboratoriju na neporemećenom i poremećenom tlu zasićenjem stupca tla vodom kapilarnim transportom. Posebno je korištan kod poremećenih tala i može biti i do 30 % viši od poljskog kapaciteta (1). Osim toga, pokusom ga je lakše odrediti nego pouzdane vrijednosti FC.

Napomene:

[1] Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Dodatak 2.

SADRŽAJI VLAGE (g vode na 100 g suhog tla) U RAZLIČITIM VRSTAMA TLA IZ RAZLIČITIH ZEMALJA

Vrsta tla	Zemlja	Sadržaj vlage tla pri		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Pijesak	Njemačka	28,7	8,8	3,9
Ilovasti pijesak	Njemačka	50,4	17,9	12,1
Ilovasti pijesak	Švicarska	44,0	35,3	9,2
Praškasta ilovača	Švicarska	72,8	56,6	28,4
Glinasta ilovača	Brazil	69,7	38,4	27,3
Glinasta ilovača	Japan	74,4	57,8	31,4
Pjeskasta ilovača	Japan	82,4	59,2	36,0
Praškasta ilovača	SAD	47,2	33,2	18,8
Pjeskasta ilovača	SAD	40,4	25,2	13,3

([1]) Vodni kapacitet.

▼B

Dodatak 3.

Slika 1.

Primjer protočne aparature za proučavanje pretvorbe kemikalija u tlu ([1]) ([2])

1: iglični ventil

2: boca za pranje plina s vodom

3: ultramembrana (samo sterilni uvjeti), veličina pora 0,2 µm

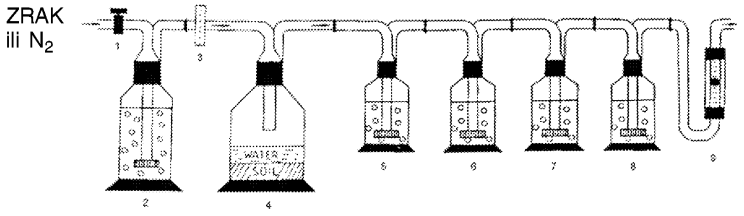
4: tikvica za metabolizam tla (natopljeno vodom, samo za anaerobne uvjete i uvjete rižinog polja)

5: etilenglikolski odvajač za hlapljive organske spojeve

6: odvajač sa sumpornom kiselinom za lužnate hlapljive spojeve

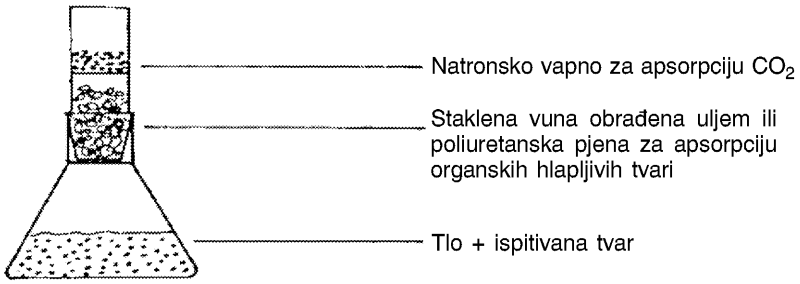
7, 8: odvajač s natrijevim hidroksidom za CO_2 i druge kisele hlapljive tvari

9: mjerač protoka



Slika 2.

Primjer tikvice biometarskog tipa za proučavanje pretvorbe kemikalija u tlu ([3])



([1]) Guth, J.A., (1980) The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, str. 123-157.

([2]) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, str. 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E., (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, str. 141-146.

▼B

C.24. AEROBNA I ANAEROBNA PRETVORBA U SUSTAVIMA VODENOG SEDIMENTA

1. METODA

Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD TG 308 (2002.).

1.1. UVOD

Kemikalije mogu ući u plitke i duboke površinske vode različitim putevima, kao što je izravna primjena, rasap, otjecanje, ocjeđivanje, odlaganje otpada, industrijske, komunalne i poljoprivredne otpadne vode ili atmosfersko taloženje. U ovoj ispitnoj metodi opisana je laboratorijska metoda za ocjenjivanje aerobne i anaerobne pretvorbe organskih kemikalija u sustavima vodenog sedimenta. Ona se temelji na postojećim smjernicama (1)(2)(3)(4)(5)(6). Na radionici OECD-a o odabiru tala/sedimenata održanoj u talijanskom Belgiratu 1995. (7) posebno su dogovoreni broj i vrste sedimenata koje će se koristiti u ovom testu. Osim toga, dane su preporuke u vezi sa skupljanjem, rukovanjem i skladištenjem uzoraka sedimenta na temelju smjernice ISO (8). Ovakva su istraživanja potrebna u slučaju kemikalija koje se izravno primjenjuju u vodu odnosno koje bi mogle dospjeti u vodni okoliš gore navedenim putevima.

Uvjeti u prirodnim sustavima vodenog sedimenta često su aerobni u gornjoj vodenoj fazi. Površinski sloj sedimenta može biti aeroban ili anaeroban, dok je dublji sediment obično anaeroban. Kako bi se obuhvatile sve te mogućnosti, u ovom su dokumentu opisani aerobni i anaerobni testovi. Aerobni test simulira aerobni vodeni stupac iznad aerobnog sloja sedimenta koji je podložen anaerobnm gradijentom. Anaerobni test simulira potpuno anaerobni sustav voda-sediment. Ako okolnosti zahtijevaju da se značajno odstupi od tih preporuka, primjerice korištenjem netaknutih sedimentnih jezgri ili sedimenata koji su možda već bili izloženi ispitivanoj tvari, za to su raspoložive druge metode (9).

1.2. DEFINICIJE

U svakom slučaju treba koristiti jedinice Međunarodnog sustava jedinica (SI).

Ispitivana tvar: bilo koja tvar, bilo polazni spoj ili relevantni proizvodi pretvorbe.

Proizvodi pretvorbe: sve tvari koje nastaju u biotičkim i abiotičkim reakcijama pretvorbe ispitivane tvari, uključujući CO_2 i vezane ostatke.

Vezani ostaci: „vezani ostaci” predstavljaju spojeve u tlu, biljki ili životinji koji nakon ekstrakcija ostaju u matrici u obliku polazne tvari ili njezinog(-ih) metabolita. Metoda ekstrakcije ne smije znatno promijeniti same spojeve niti strukturu matrice. Vrsta veze može se djelomično razjasniti ekstrakcijskim metodama koje mijenjaju matricu i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Do sada su na taj način utvrđene npr. kovalentne ionske i sorpcijske veze te uklapanja. Općenito, tvorba vezanih ostataka značajno smanjuje biodostupnost i bioraspoloživost (10) (prilagođeno na temelju IUPAC-a 1984. (11)).

▼B

Aerobna pretvorba: (oksidacijska): reakcije koje se odvijaju u prisutnosti molekularnog kisika (12).

Anaerobna pretvorba: (redukcijska): reakcije koje se odvijaju bez pristupa molekularnog kisika (12).

Prirodne vode: površinske vode dobivene iz jezeraca, rijeka, potoka itd.

Sediment: mješavina mineralnih sastojaka i organsko-kemijskih sastojaka koji sadrže spojeve velike molekulske mase s visokim sadržajem ugljika i dušika. Nastaje taloženjem iz vode i čini sučelje s vodom.

Mineralizacija: potpuna razgradnja organskog spoja u CO_2 i H_2O u aerobnim uvjetima i CH_4, CO_2 i H_2O u anaerobnim uvjetima. Ako se u kontekstu ove ispitne metode koristi radioaktivno obilježeni spoj, mineralizacija znači opsežnu razgradnju molekule tijekom koje se obilježeni atom ugljika kvantitativno oksidira ili reducira uz otpuštanje odgovarajuće količine $^{14}CO_2$ odnosno $^{14}CH_4$.

Vrijeme poluraspada, $t_{0,5}$: vrijeme koje je potrebno za 50 %-tnu pretvorbu ispitivane tvari, ako se pretvorba može opisati kinetikom prvog reda; ono je neovisno o početnoj koncentraciji.

DT_{50} (vrijeme nestajanja 50): vrijeme u kojemu se početna koncentracija ispitivane tvari smanji za 50 %.

DT_{75} (VRIJEME NESTAJANJA 75): VRIJEME U KOJEMU SE POČETNA KONCENTRACIJA ISPITIVANE TVARI SMANJI ZA 75 %.

DT_{90} (vrijeme nestajanja 90): vrijeme u kojemu se početna koncentracija ispitivane tvari smanji za 90 %.

1.3. REFERENTNE TVARI

Referentne tvari treba koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda pretvorbe spektroskopskim i kromatografskim metodama.

1.4. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Za mjerenje brzine pretvorbe mogu se koristiti neobilježene ispitivane tvari i ispitivane tvari obilježene radioaktivnim izotopom, s time da se prednost daje obilježenom materijalu. Za proučavanje puta pretvorbe i utvrđivanje bilance mase potreban je obilježeni materijal. Preporučuje se ^{14}C obilježavanje, ali korisna je i primjena drugih izotopa, kao što su ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Ako je to moguće, oznaku treba staviti na najstabilni dio odnosno dijelove molekule ([1]). Kemijska i/ili radiokemijska čistoća ispitivane tvari treba biti najmanje 95 %.

Prije ispitivanja trebaju biti raspoložive sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

(a) topljivost u vodi (metoda A.6.);

(b) topljivost u organskim otapalima;

(c) tlak pare (metoda A.4.) i konstanta Henryjevog zakona;

([1]) Primjerice, ako tvar sadrži jedan prsten, oznaka se mora staviti na taj prsten; ako ispitivana tvar sadrži dva ili više prstenova, ponekad je potrebno provesti posebna istraživanja kako bi se ocijenila sudbina svakog obilježenog prstena i dobile potrebne informacije o nastajanju proizvoda pretvorbe.

▼B

(d) podjelni koeficijent n-oktanol/voda (metoda A.8.);

(e) koeficijent adsorpcije (K_d, K_f ili $K_{oc,}$ prema potrebi) (metoda C.18.);

(f) hidroliza (metoda C.7.);

(g) konstanta disocijacije (pK_a) (smjernica OECD 112) (13);

(h) kemijska struktura ispitivane tvari i položaj izotopne oznake odnosno oznaka (prema potrebi).

Napomena: treba navesti temperaturu na kojoj su provedena ta mjerenja.

Osim toga, korisno je imati podatke o toksičnosti ispitivane tvari za mikroorganizme, podatke o lakoj i/ili svojstvenoj biorazgradivosti i podatke o aerobnoj i anaerobnoj pretvorbi u tlu.

Trebaju biti raspoložive analitičke metode (uključujući metodu ekstrakcije i pročišćavanja) za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivane tvari i njezinih proizvoda pretvorbe u vodi i sedimentu (vidjeti odjeljak 1.7.2.).

1.5. NAČELO ISPITNE METODE

U metodi koja je ovdje opisana koristi se sustav aerobnog i anaerobnog vodenog sedimenta (vidjeti Dodatak 1.) koji omogućuje:

mjerenje brzine pretvorbe ispitivane tvari u sustavu voda-sediment,

mjerenje brzine pretvorbe ispitivane tvari u sedimentu,

mjerenje brzine mineralizacije ispitivane tvari i/ili proizvoda pretvorbe (ako se koristi ^{14}C obilježena ispitivana tvar),

identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda pretvorbe u vodenoj i sedimentnoj fazi, uključujući bilancu mase (ako se koristi obilježena ispitivana tvar),

mjerenje razdiobe ispitivane tvari i njezinih proizvoda pretvorbe između dviju faza u razdoblju inkubacije u mraku (npr. kako bi se izbjeglo cvjetanje algi) na stalnoj temperaturi. Ako podaci na to upućuju, određuju se vremena poluraspada, vrijednosti DT_{50}, DT_{75} i DT_{90}, ali se ne smiju ekstrapolirati daleko izvan pokusnog razdoblja (vidjeti odjeljak 1.2.).

Potrebna su najmanje dva sedimenta i pripadajuća voda, kako za aerobna tako i za anaerobna istraživanja (7). Ipak, ponekad je potrebno koristiti više od dva vodena sedimenta, primjerice kod kemikalija koje mogu biti prisutne u slatkovodnoj i/ili morskoj sredini.

▼B

1.6. PRIMJENLJIVOST TESTA

Metoda se općenito može primijeniti na sve kemikalije (neobilježene i obilježene) za koje je raspoloživa dovoljno točna i osjetljiva analitička metoda. Ona se može primijeniti na blago hlapljive i nehlapljive spojeve kao i na vodotopljive spojeve i spojeve koji su slabo topljivi u vodi. Ovaj test ne treba primjenjivati u slučaju kemikalija koje su jako hlapljive iz vode (npr. fumiganti, organska otapala) te se stoga ne mogu zadržati u vodi i/ili sedimentu u pokusnim uvjetima ovog testa.

Metoda je do sada korištena za proučavanje pretvorbe kemikalija u slatkim vodama i sedimentima, ali se u načelu može primijeniti i na estuarijske/morske sustave. Nije prikladna za simulaciju uvjeta u tekućicama (npr. rijeke) ili otvorenom moru.

1.7. KRITERIJI KAKVOĆE

1.7.1. **Iskorištenje**

Prve naznake ponovljivosti analitičke metode i uspješnosti jednolike primjene ispitivane tvari mogu se dobiti ekstrakcijom i analizom najmanje dva paralelna uzorka vode i sedimenta neposredno nakon dodavanja ispitivane tvari. Iskorištenja u kasnijim fazama pokusa proizlaze iz odgovarajućih bilanci mase (ako se koristi obilježeni materijal). Iskorištenje se treba kretati u području od 90 % do 110 % kod obilježenih kemikalija (6) i od 70 % do 110 % kod neobilježenih kemikalija.

1.7.2. **Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode**

Ponovljivost analitičke metode (bez početne učinkovitosti ekstrakcije) kod kvantifikacije ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe može se provjeriti dvostrukom analizom istog ekstrakta uzoraka vode odnosno sedimenta koji su inkubirani dovoljno dugo da nastanu proizvodi pretvorbe.

Granica detekcije (limit of detection, LOD) analitičke metode za ispitivanu tvar i proizvode pretvorbe treba biti najmanje 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ u vodi odnosno sedimentu (kao ispitivana tvar) ili 1 % početne količine primijenjene na ispitni sustav, ovisno o tome što je manje. Također je potrebno navesti granicu kvantifikacije (limit of quantification, LOQ).

1.7.3. **Točnost podataka o pretvorbi**

Regresijska analiza koncentracija ispitivane tvari kao funkcije vremena daje odgovarajuće informacije o točnosti krivulje pretvorbe i omogućuje izračun granica pouzdanosti za vremena poluraspada (u slučaju primjene kinetike pseudoprvog reda) odnosno vrijednosti DT_{50} i, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90}.

1.8. OPIS METODE

1.8.1. ***Ispitni sustav i aparatura***

Istraživanje se provodi u staklenim posudama (npr. boce, epruvete za centrifugiranje), osim ako preliminarne informacije (kao što je podjelni koeficijent n-oktanol-voda, podaci o sorpciji itd.) ukazuju na to da ispitivana tvar prianja na staklo, u kom slučaju treba razmisliti o alternativnom materijalu (kao što je teflon). Ako je poznato da ispitivana tvar prianja na staklo, problem se može ublažiti primjenom jedne ili više sljedećih metoda:

▼B

— određivanje mase ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe sorbiranih na staklo,

— pranje svog staklenog posuđa otapalom na kraju ispitivanja,

— korištenje formuliranih proizvoda (vidjeti i odjeljak 1.9.2.),

— korištenje veće količine pomoćnog otapala za dodavanje ispitivane tvari u sustav; ako se koristi pomoćno otapalo, to treba biti otapalo koje ne solvolizira ispitivanu tvar.

Primjeri tipične ispitne aparature tj. plinski protočni sustav i sustav biometarskog tipa prikazani su u Dodatku 2. odnosno 3. (14). Drugi korisni inkubacijski sustavi opisani su u literaturi (15). Pokusna aparatura treba omogućavati izmjenu zraka odnosno dušika i odvajanje hlapljivih proizvoda. Dimenzije aparature moraju zadovoljavati zahtjeve ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.9.1.). Zračenje se može postići nježnim upuhivanjem ili prevođenjem zraka odnosno dušika preko površine vode. U ovom posljednjem slučaju preporučuje se nježno miješati vodu odozgora radi bolje razdiobe kisika odnosno dušika u vodi. Ne smije se koristiti zrak bez CO_2 jer on može dovesti do povećanja pH vrijednosti vode. U svakom slučaju, remećenje sedimenta nepoželjno je i treba ga što je moguće više izbjegavati. Blago hlapljive kemikalije treba ispitati u sustavu biometarskog tipa uz nježno miješanje vodene površine. Mogu se koristiti i zatvorene posude u kojima je prostor iznad uzroka ispunjen atmosferskim zrakom ili dušikom, unutar kojih su smještene bočice za odvajanje hlapljivih proizvoda (16). Kod aerobnog ispitivanja potrebno je osigurati redovitu izmjenu plina iznad uzorka kako bi se kompenzirala potrošnja kisika biomase.

Prikladni odvajači za skupljanje hlapljivih proizvoda pretvorbe su, između ostaloga, otopine kalijevog hidroksida ili natrijevog hidroksida (1 mol· dm^{-3}) za ugljikov dioksid ([1]) i etilenglikol, etanolamin ili 2 %-tni parafin u ksilenu za organske spojeve. Hlapljive tvari koje nastaju u anaerobnim uvjetima, kao što je metan, mogu se primjerice skupljati na molekulskim sitima. Te se hlapljive tvari mogu npr. sagorjeti u CO_2 provođenjem plina kroz kremenu cjevčicu napunjenu CuO na temperaturi od 900 °C i odvajanjem nastalog CO_2 u apsorberu s lužinom (17).

Potrebni su laboratorijski instrumenti za kemijsku analizu ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe (npr. plinsko-tekućinska kromatografija (GLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), tankoslojna kromatografija (TLC), spektroskopija masa (MS), plinska kromatografija – spektroskopija masa (GC-MS), tekućinska kromatografija – spektrometrija masa (LC-MS), nuklearna magnetska rezonanca (NMR) itd.), uključujući odgovarajuće detektcijske sustave za radioaktivno obilježene i neobilježene kemikalije. Ako se koristi radioaktivno obilježeni materijal, također je potreban tekućinski scintilacijski brojač i oksidacijsko sredstvo (za izgaranje uzoraka sedimenta prije analize radioaktivnosti).

Prema potrebi treba koristiti i drugu standardnu laboratorijsku opremu za fizikalno-kemijska i biološka određivanja (vidjeti odjeljak 1.8.2.2. tablicu 1.), stakleno posuđe, kemikalije i reagense.

([1]) Budući da ove lužnate apsorpcijske otopine također apsorbiraju ugljikov dioksid iz ventilacijskog zraka kao i ugljikov dioksid nastao disanjem u aerobnim pokusima, one se moraju redovito mijenjati kako bi se izbjeglo zasićenje, a time i gubitak njihove apsorpcijske sposobnosti.

▼B

1.8.2. **Odabir i broj vodenih sedimenata**

Mjesta uzorkovanja treba odabrati u skladu sa svrhom ispitivanja. Kod odabira mjesta uzorkovanja treba uzeti u obzir moguću povijest unosa materijala iz poljoprivrede, industrije i kućnanstava u sliv i vode uzvodno. Sedimenti se ne smiju koristiti ako su u posljednje četiri godine onečišćeni ispitivanom tvari ili njezinim strukturnim analozima.

1.8.1.2. *Odabir sedimenata*

Kod aerobnih se istraživanja uglavnom koriste dva sedimenta (7). Dva odabrana sedimenta trebaju biti različita s obzirom na sadržaj organskog ugljika i teksturu. Jedan sediment treba imati visok sadržaj organskog ugljika (2,5–7,5 %) i finu teksturu, a drugi sediment treba imati nizak sadržaj organskog ugljika (0,5–2,5 %) i grubu teksturu. Razlika u sadržaju organskog ugljika u pravilu treba biti najmanje 2 %. „Fina tekstura" je definirana kao sadržaj (glina + prah) ([1]) > 50 %, a „gruba tekstura" kao sadržaj (glina + prah) < 50 %. Razlika u sadržaju (glina + prah) između dva sedimenta treba u pravilu biti najmanje 20 %. Ako kemikalija može dospjeti i u morske vode, barem jedan sustav voda-sediment treba biti morskog podrijetla.

Kod strogo anaerobnog istraživanja treba uzeti dva uzorka sedimenta (uključujući pripadajuću vodu) iz anaerobnih zona površinskih vodnih cjelina (7). Sedimentnom i vodenom fazom treba pažljivo rukovati i pažljivo ih prenositi bez pristupa kisika.

Za odabir sedimenata mogu biti važni i drugi parametri, koje treba uzeti u obzir ovisno o slučaju. Primjerice, područje pH vrijednosti sedimenata važno je kod ispitivanja kemikalija kod kojih pretvorba i/ili sorpcija ovisi o pH. Ovisnost sorpcije o pH može se očitovati u vrijednosti pK_a ispitivane tvari.

1.8.2.2. *Opisivanje uzoraka voda-sediment*

Pregled ključnih parametara za vodu i sediment koje treba mjeriti i navesti u izvješću (s uputom na primijenjenu metodu) dan je u tablici u nastavku zajedno s fazom ispitivanja u kojoj se ti parametri određuju. Informacije o metodama za određivanje tih parametara mogu se pronaći u referencama (18)(19)(20)(21).

Osim toga, u pojedinim je slučajevima potrebno izmjeriti i navesti i druge parametre (npr. za slatke vode: čestice, alkalitet, tvrdoća, vodljivost, NO_3/PO_4 (omjer i pojedinačne vrijednosti); za sedimente: kapacitet izmjene kationa, vodni kapacitet, karbonat, ukupni dušik i fosfor; za morske sustave: salinitet). Kod ocjenjivanja redoks uvjeta, posebno kod anaerobne pretvorbe, također je korisno napraviti analizu sedimenata i vode na nitrat, sulfat, bioraspoloživo željezo i moguće druge akceptore elektrona.

([1]) (Glina + prah) je mineralna frakcija sedimenta veličine čestica < 50 μm.

▼B

Mjerenje parametara za opisivanje uzoraka voda-sediment (7)(22)(23)

Parametar	Faza ispitnog postupka					
	uzorkovanje na terenu	rukovanje	početak aklimatizacije	početak ispitivanja	tijekom ispitivanja	kraj ispitivanja
Voda						
Podrijetlo/izvor	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Koncentracija O_2*	x		x	x	x	x
Redoks potencijal*			x	x	x	x
Sediment						
Podrijetlo/izvor	x					
Dubina sloja	x					
pH		x	x	x	x	x
Razdioba veličina čestica		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobna biomasa (*)		x		x		x
Redoks potencijal (**)	Promatranje (boja/miris)		x	x	x	x

(*) Metoda stope mikrobnog disanja (26), metoda fumigacije (27) ili brojenje na pločama (npr. bakterije, aktinomicete, gljivice i ukupne kolonije) kod aerobnih istraživanja; brzina metanogeneze kod anaerobnih istraživanja.

(**) Noviji rezultati istraživanja pokazuju da mjerenja koncentracije kisika u vodi i redoks potencijala nemaju mehanističku niti prognostičku vrijednost za rast i razvoj mikrobnih populacija u površinskim vodama (24)(25). Određivanje biokemijske potrošnje kisika (BPK) (kod uzorkovanja na terenu, na početku i kraju ispitivanja) i koncentracija mikro/makronutrijenata Ca, Mg i Mn (na početku i kraju ispitivanja) u vodi te mjerenje ukupnog N i ukupnog P u sedimentima (kod uzorkovanja na terenu i na kraju ispitivanja) mogu biti bolji alati za tumačenje i ocjenjivanje brzina i puteva aerobne biološke pretvorbe.

1.8.3. **Skupljanje, rukovanje i skladištenje**

1.8.3.1. *Skupljanje*

Kod uzorkovanja sedimenta treba koristiti nacrt smjernice ISO o uzorkovanju sedimenta s dna (8). Uzorke sedimenata treba uzeti iz čitavoga gornjeg sloja sedimenta debljine od 5 do 10 cm. Pripadajuću vodu treba uzeti na istoj lokaciji odnosno mjestu i u isto vrijeme kad i sediment. Kod anaerobnih istraživanja sedimente i pripadajuću vodu treba uzorkovati i prenositi bez pristupa kisika (28) (vidjeti odjeljak 1.8.2.1.). Neki uređaji za uzorkovanje opisani su u literaturi (8)(23).

▼B

1.8.3.2. *Rukovanje*

Sediment se odvoji od vode filtriranjem i mokro prosije kroz 2-milimetarsko sito koristeći višak vode s mjesta uzorkovanja, koja se nakon tog baca. Zatim se poznate količine sedimenata i vode pomiješaju u željenom omjeru (vidjeti odjeljak 1.9.1.) u inkubacijskim tikvicama i pripreme za aklimatizaciju (vidjeti odjeljak 1.8.4.). Kod anaerobnih istraživanja sva se rukovanja trebaju odvijati bez pristupa kisika (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3. *Skladištenje*

U svakom se slučaju preporučuje korištenje svježe skupljenih uzoraka sedimenta i vode; međutim, ako je skladištenje nužno, sediment i vodu treba prosijati na način kako je opisano gore i zajedno uskladištiti (sediment mora biti natopljen vodom, sloj vode 6–10 cm) u mraku na 4 ± 2 °C[4] najduže četiri tjedna (7)(8)(23). Uzorke koji se koriste u aerobnim istraživanjima treba pohraniti uz slobodan dotok zraka (npr. u otvorenim spremnicima), dok se uzorci za anaerobna istraživanja skladište bez pristupa kisika. Sediment i voda se tijekom prijenosa i skladištenja ne smiju zamrznuti i ne smije doći do isušivanja sedimenta.

1.8.4. **Priprema uzoraka sediment/voda za ispitivanje**

Prije dodavanja ispitivane tvari treba provesti aklimatizaciju, pri čemu svaki uzorak sediment/voda treba smjestiti u inkubacijsku posudu koja će se koristiti u glavnom ispitivanju; aklimatizacija se mora odvijati u potpuno istim uvjetima kao inkubacija za vrijeme ispitivanja (vidjeti odjeljak 1.9.1.). Razdoblje aklimatizacije je vrijeme potrebno da se postigne potrebna stabilnost sustava, na što ukazuje pH, koncentracija kisika u vodi, redoks potencijal sedimenta i vode i makroskopsko odvajanje faza. Razdoblje aklimatizacije u pravilu treba trajati između jednog i dva tjedna i ne smije biti duže od četiri tjedna. Rezultate određivanja provedenih u tom razdoblju treba navesti u izvješću o ispitivanju.

1.9. PROVOĐENJE ISPITIVANJA

1.9.1. **Ispitni uvjeti**

Ispitivanje se provodi u aparaturi za inkubaciju (vidjeti odjeljak 1.8.1.) uz omjer volumena vode i sedimenta između 3:1 i 4:1 i sloj sedimenta od 2,5 cm (± 0,5 cm). ([1]) Preporučuje se korištenje najmanje 50 g sedimenta (na bazi suhe mase) po inkubacijskoj posudi.

Ispitivanje se provodi u mraku na stalnoj temperaturi u području od 10 do 30 C°. Prikladna je temperatura (20 ± 2)°C. U pojedinim slučajevima, ovisno o informacijama koje treba pribaviti ispitivanjem, može se uvesti još jedna, niža temperatura (npr. 10 C°). Temperaturu inkubacije treba pratiti i dokumentirati.

([1]) Novija istraživanja pokazuju da skladištenje na 4 °C može dovesti do smanjenja sadržaja organskog ugljika u sedimentu, što može rezultirati smanjenjem mikrobne aktivnosti (34).

▼B

1.9.2. **Obrada i primjena ispitivane tvari**

Koristi se jedna ispitna kocentracija kemikalije ([1]). U slučaju sredstava za zaštitu bilja koja se primjenjuju izravno u vodne cjeline, treba koristiti najvišu dozu navedenu na etiketi kao maksimalnu količinu primjene, koju treba preračunati s obzirom na površinu vode u ispitnoj posudi. U svim drugim slučajevima treba koristiti koncentraciju na temelju predviđanja iz emisija u okoliš. Treba voditi računa da koncentracija ispitivane tvari bude dovoljna za opisivanje puta pretvorbe i tvorbe i razgradnje proizvoda pretvorbe. Ponekad je potrebno primijeniti i više doze (npr. 10 puta više), ako se na početku istraživanja koncentracije ispitivane tvari nalaze u blizini granica detekcije i/ili ako se glavni proizvodi pretvorbe koji čine 10 % količine primjene ispitivane tvari teško utvrđuju. Ipak, ako se koriste više ispitne koncentracije, one ne smiju imati značajan štetni učinak na mikrobnu aktivnost sustava voda-sediment. Da bi se postigla stalna koncentracija ispitivane tvari u posudama različitih dimenzija, u pojedinim je slučajevima preporučljivo prilagoditi količinu tvari na temelju dubine vodenog stupca u posudi u odnosu na dubinu vode na terenu (za koju se uzima da iznosi 100 cm, ali mogu se koristiti i druge dubine). Za primjer izračuna vidjeti Dodatak 4.

U idealnom slučaju ispitivanu tvar treba dodati u vodenu fazu ispitnog sustava u obliku vodene otopine. Uporaba malih količina otapala mješljivih s vodom (kao što je aceton, etanol) dopuštena je ako je to nužno za primjenu i razdiobu ispitivane tvari, ali njihova koncentracija ne smije biti viša od 1 % v/v i ona ne smiju imati štetni učinak na mikrobnu aktivnost ispitnog sustava. Vodenu otopinu ispitivane tvari treba pažljivo pripremiti – u odgovarajućim slučajevima treba razmisliti o korištenju generatorskih kolona ili prethodnom miješanju kako bi se osigurala potpuna homogenost. Nakon dodavanja vodene otopine u ispitni sustav preporučuje se nježno miješanje vodene faze uz što manje remećenja sedimenta.

Uporaba formuliranih proizvoda se u pravilu ne preporučuje, budući da sastojci formulacije mogu utjecati na razdiobu ispitivane tvari i/ili proizvoda pretvorbe između vodene i sedimentne faze. Ipak, kod ispitivanih tvari koje su slabo topljive u vodi uporaba formuliranog materijala može biti prikladna alternativa.

Broj inkubacijskih posuda ovisi o broju vremena uzorkovanja (vidjeti odjeljak 1.9.3.). Treba predvidjeti dovoljan broj ispitnih sustava kako bi se kod svakog uzorkovanja mogla žrtvovati po dva sustava. Ako se koriste kontrolne jedinice za svaki vodeni sediment, one se ne obrađuju ispitivanom tvari. Kontrolne jedinice mogu se koristiti za određivanje mikrobne biomase sedimenta i ukupnog organskog ugljika vode i sedimenta na kraju istraživanja. Dvije kontrolne jedinice (tj. po jedna za svaki vodeni sediment) mogu se koristiti za praćenje traženih parametara u sedimentu i vodi u razdoblju aklimatizacije (vidjeti tablicu u odjeljku 1.8.2.2.). Ako se ispitivana tvar primjenjuje uz pomoć otapala, potrebno je uvesti dvije dodatne kontrolne jedinice za mjerenje štetnih učinaka na mikrobnu aktivnost ispitnog sustava.

([1]) Ispitivanje s drugom koncentracijom može biti korisno kod kemikalija koje dospijevaju u površinske vode različitim putevima te zbog nastaju značajne razlike u koncentracijama, ali samo ako se donja koncentracija može analizirati s dostatnom točnošću.

▼B

1.9.3. **Trajanje ispitivanja i uzorkovanje**

Pokus u pravilu ne bi smio trajati duže od 100 dana (6), a treba ga provoditi dok se ne utvrdi put razgradnje i obrazac razdiobe voda/sediment odnosno dok se 90 % ispitivane tvari ne izgubi pretvorbom i/ili hlapljenjem. Treba predvidjeti najmanje šest vremena uzorkovanja (uključujući nulto vrijeme), a fakultativno se može provesti i preliminarno istraživanje (vidjeti odjeljak 1.9.4.) radi utvrđivanja odgovarajućeg režima uzorkovanja i trajanja ispitivanja, osim ako o ispitivanoj tvari već ima dovoljno podataka iz ranijih istraživanja. Kod ispitivanja hidrofobnih tvari ponekad je potrebno uvesti dodatna uzorkovanja u početnoj fazi istraživanja kako bi se odredila stopa razdiobe između vodene faze i faze sedimenta.

U odgovarajućim vremenima uzorkovanja uzimaju se na analizu čitave inkubacijske posude (s ponavljanjima). Sediment i voda iznad sedimenta analiziraju se odvojeno ([1]). Površinsku vodu treba pažljivo ukloniti uz minimalno remećenje sedimenta. Prilikom ekstrakcije i opisivanja ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe treba primjenjivati odgovarajuće analitičke postupke. Osim toga, treba paziti da se ukloni materijal adsorbiran na inkubacijsku posudu ili spojne cijevi koje služe za hvatanje hlapljivih tvari.

1.9.4. **Fakultativno preliminarno ispitivanje**

Ako se trajanje i režim uzorkovanja ne mogu procijeniti na temelju drugih relevantnih istraživanja o ispitivanoj tvari, treba razmisliti o provedbi fakultativnog preliminarnog ispitivanja, koje se provodi u istim ispitnim uvjetima kao glavno istraživanje. Ako se provodi preliminarno ispitivanje, treba ukratko navesti odgovarajuće pokusne uvjete i rezultate ispitivanja.

1.9.5. **Mjerenja i analiza**

Kod svakog uzorkovanja treba izmjeriti i navesti koncentraciju ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe u vodi i sedimentu (kao koncentracija i kao postotak primijenjene doze). Općenito, treba identificirati proizvode pretvorbe koji u bilo kojem vremenu uzorkovanja pokazuju ≥ 10 % primijenjene radioaktivnosti u čitavom sustavu voda-sediment, osim ako postoje opravdani razlozi da se to ne učini. Također treba razmisliti o identifikaciji proizvoda pretvorbe čije se koncentracije stalno povećavaju tijekom istraživanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze gore spomenute granice, budući da to može ukazivati na njihovu postojanost. O tome treba odlučiti ovisno o slučaju i u izvješću navesti odgovarajuće obrazloženje.

Potrebno je navesti rezultate iz sustava za odvajanje plinova/hlapljivih tvari (CO_2 i drugi tj. hlapljivi organski spojevi) u svakom vremenu uzorkovanja. Treba navesti brzine mineralizacije. Osim toga, treba navesti neizlučljive (vezane) ostatke u svakom vremenu uzorkovanja.

([1]) U slučajevima kad može doći do brze reoksidacije proizvoda anaerobne pretvorbe, za vrijeme uzorkovanja i analize treba održavati anaerobne uvjete.

▼B

2. **PODACI**

2.1. OBRADA REZULTATA

Za svako vrijeme uzorkovanja treba izračunati ukupnu bilancu mase ili iskorištenje (vidjeti odjeljak 1.7.1.) dodane radioaktivnosti. Rezultate treba navesti kao postotak dodane radioaktivnosti. Osim toga, treba navesti razdiobu radioaktivnosti između vode i sedimenta kao koncentraciju i postotak u svakom vremenu uzorkovanja.

Treba izračunati vrijeme poluraspada, DT_{50} te, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90} ispitivane tvari, zajedno s granicama pouzdanosti (vidjeti odjeljak 1.7.3.). Podaci o gubicima ispitivane tvari u vodi i sedimentu mogu se dobiti primjenom odgovarajućih alata za ocjenjivanje. Ti alati mogu biti vrlo različiti, od kinetike pseudoprvog reda i tehnika empirijskog prilagođavanja krivulje uz primjenu grafičkih i numeričkih rješenja do složenijih proračuna npr. uz primjenu jednodjelnih i višedjelnih modela. Dodatne informacije mogu se pronaći u relevantnoj literaturi (35)(36)(37).

Svi pristupi imaju prednosti i nedostatke i znatno se razlikuju prema složenosti. Pretpostavka kinetike prvog reda može značiti pretjerano pojednostavnjivanje procesa razgradnje i razdiobe, ali tamo gdje je moguća daje vrijednost (konstanta brzine ili vrijeme poluraspada) koja je lako razumljiva i od značaja za simulacijsko modeliranje i izračune predviđenih koncentracija u okolišu. Empirijskim pristupima i linearnim transformacijama može se postići bolje prilagođavanje krivulja podacima, a time i bolja procjena vremena poluraspada, vrijednosti DT_{50} te, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90}. Ipak, primjena tih izvedenih konstanti ograničena je. Modeli s odjeljcima mogu dati niz korisnih konstanti značajnjih za ocjenjivanje rizika koje opisuju brzinu razgradnje u različitim odjeljcima i razdiobu kemikalije. Njih također treba koristiti za procjenu konstanti brzine tvorbe i razgradnje glavnih proizvoda pretvorbe. U svakom slučaju, odabranu metodu treba obrazložiti i izvođač pokusa treba grafički i/ili statistički dokazati valjanost podudaranja.

3. **IZVJEŠĆIVANJE**

3.1. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izvješće mora sadržavati sljedeće informacije:

ispitivana tvar:

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (uz naznaku mjesta oznake odnosno oznaka ako se koristi radioaktivno obilježeni materijal) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— čistoća (nečistoće) ispitivane tvari,

— radiokemijska čistoća obilježene kemikalije i molarna aktivnost (prema potrebi).

▼B

Referentne tvari:

— kemijski naziv i struktura referentnih tvari koje se koriste za opisivanje i/ili identifikaciju proizvoda pretvorbe.

Ispitni sedimenti i voda:

— lokacija i opis mjesta uzorkovanja vodenog sedimenta, po mogućnosti uključujući povijest onečišćenja,

— sve informacije o skupljanju, skladištenju (prema potrebi) i aklimatizaciji sustava voda-sediment,

— svojstva uzoraka voda-sediment navedena u tablici u odjeljku 1.8.2.2.

Ispitni uvjeti:

— primijenjeni sustav ispitivanja (npr. protočni, biometar, način prozračivanja, metoda miješanja, volumen vode, masa sedimenta, debljina sloja vode i sedimenta, dimenzije ispitnih posuda itd.),

— primjena ispitivane tvari na ispitni sustav: ispitna koncentracija, broj ponavljanja i kontrolnih uzoraka, način primjene ispitivane tvari (npr. uporaba otapala) itd.,

— temperatura inkubacije,

— vremena uzorkovanja,

— ekstrakcijske metode i učinkovitost ekstrakcije, analitičke metode i granice detekcije,

— metode opisivanja/identifikacije proizvoda pretvorbe,

— odstupanja od ispitnog protokola ili ispitnih uvjeta tijekom istraživanja.

Rezultati:

— sirovi podaci iz reprezentativnih analiza (sve sirove podatke treba pohraniti u arhivi DLP),

— ponovljivost i osjetljivost primijenjenih analitičkih metoda,

— stope iskorištenja (postoci za valjano istraživanje navedeni su u odjeljku 1.7.1.),

— tablice rezultata izraženih u % primijenjene doze i u $mg \cdot kg^{-1}$ u vodi, sedimentu i cjelokupnom sustavu (samo %) za ispitivanu tvar te, prema potrebi, za proizvode pretvorbe i neizlučljivu radioaktivnost,

— bilanca mase za vrijeme i na kraju istraživanja,

— grafički prikaz pretvorbe u vodenoj i sedimentnoj frakciji i u cjelokupnom sustavu (uključujući mineralizaciju),

— brzine mineralizacije,

▼B

— vrijeme poluraspada, vrijednost DT_{50} i, prema potrebi, DT_{75} i DT_{90} za ispitivanu tvar te, prema potrebi, za glavne proizvode pretvorbe, uključujući granice pouzdanosti u vodi, sedimentu i cjelokupnom sustavu,

— ocjena kinetike pretvorbe ispitivane tvari i, prema potrebi, glavnih proizvoda pretvorbe,

— predloženi put pretvorbe (prema potrebi),

— rasprava rezultata.

4. **REFERENCE**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process., (1990) Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide., (1991) Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate., (1992) Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate., (1987) Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. str. 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982) Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication., (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr. Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme., (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12., (1994) Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a) Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, str. 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997) Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, str. 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987) The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, str. 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994) Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S., (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, str. 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991) Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993) Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop on Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997) Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, str. 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999) Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, str. 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985) Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, str. 197-203.

(27) ISO-14240-2., (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen., (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), str. 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, str. 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, str. 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993) Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, str. 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W., (1986) A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, str. 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997) Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, str. 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, str. 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, str. 47-60.

(37) Carlton, R.R., and Allen, R., (1994) The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, str. 1349-1354.

▼B

Dodatak 1.

SMJERNICE ZA AEROBNE I ANAEROBNE ISPITNE SUSTAVE

Aerobni ispitni sustav

Aerobni ispitni sustav opisan u ovoj ispitnoj metodi sastoji se od aerobnog vodenog sloja (tipični raspon koncentracija kisika od 7 do 10 $mg \cdot l^{-1}$) i sedimentnog sloja, koji je aeroban na površini i anaeroban ispod površine (tipični prosječni redoks potencijali (E_h) u anaerobnoj zoni sedimenta kreću se u području između – 80 i – 190 mV). Ovlaženi zrak prevodi se preko površine vode u svakoj inkubacijskoj jedinici kako bi se osigurala dovoljna količina kisika u prostoru iznad uzorka.

Anaerobni ispitni sustav

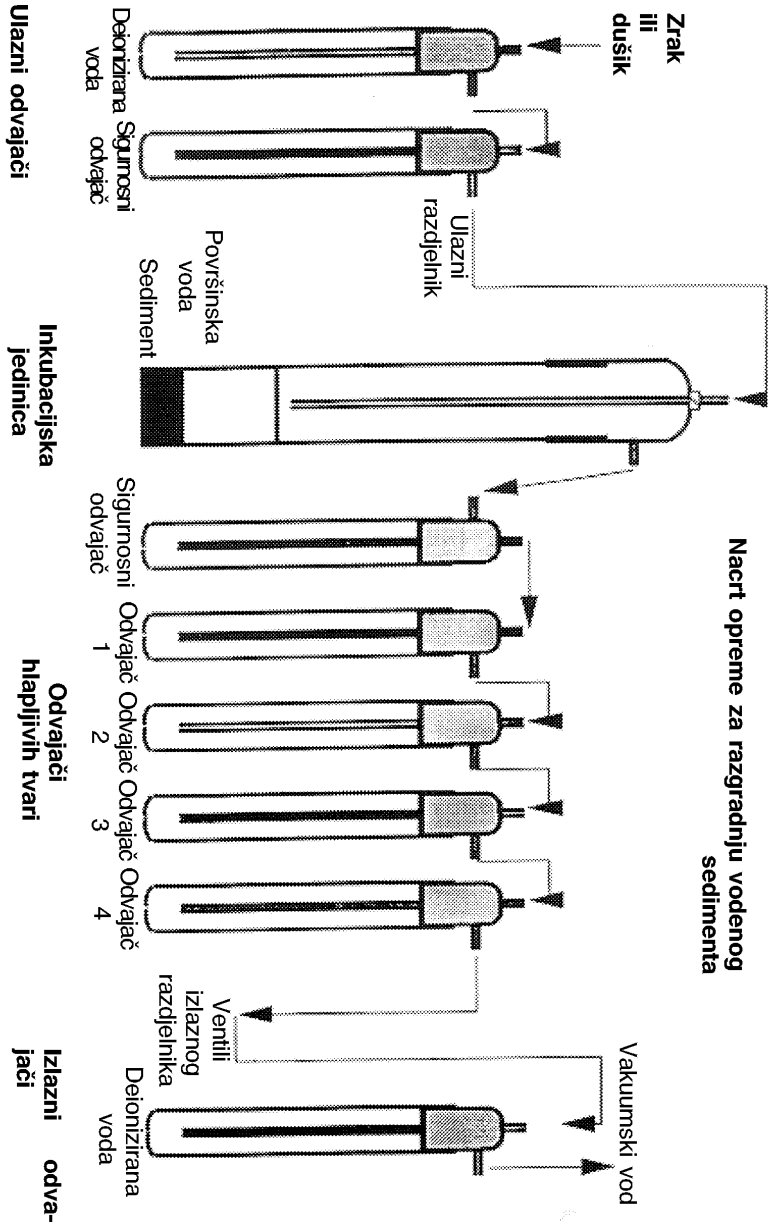
Kod anaerobnog ispitnog sustava ispitni postupak je uglavnom isti kao kod aerobnog sustava, ali se u svakoj inkubacijskoj jedinici preko površine vode prevodi ovlaženi dušik radi osiguravanja potrebnog dušika u prostoru iznad uzorka. Sediment i voda smatraju se anaerobnim kad je redoks potencijal (E_h) niži od – 100 mV.

Kod anaerobnog ispitivanja ocjenjivanje mineralizacije uključuje mjerenje razvijenog ugljikovog dioksida i metana.

▼B

Dodatak 2.

PRIMJER PLINSKE PROTOČNE APARATURE

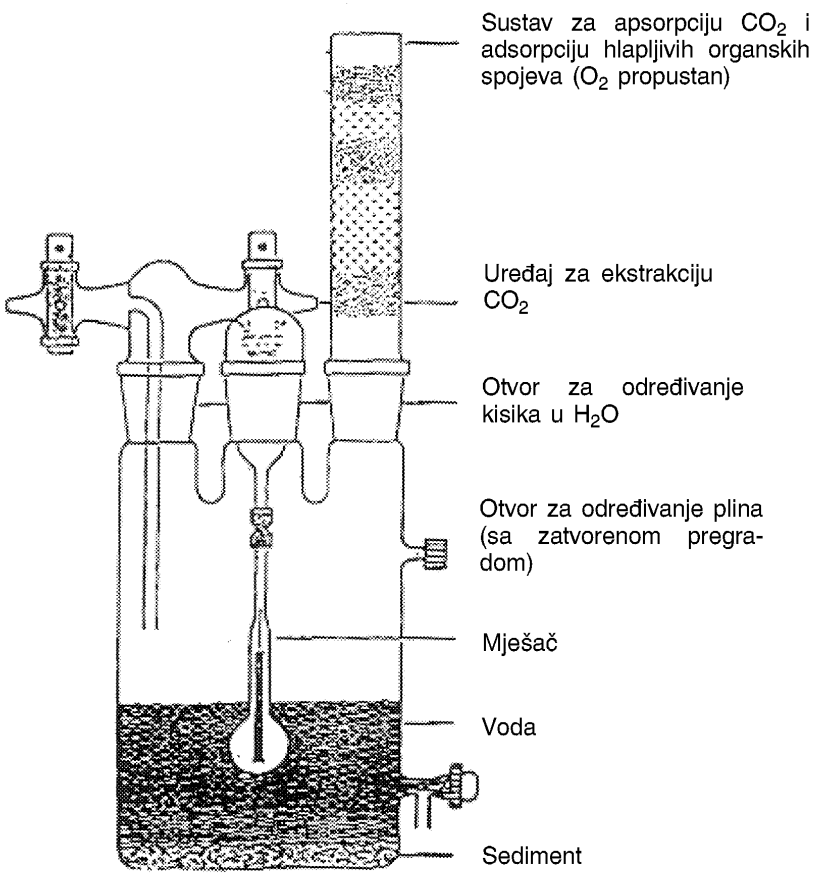


Sigurnosni odvajač,prazan
Odvajač 1:
etilenglikol za odvajanjeorganskih hlapljivih tvari
Odvajač 2:
sumporna kiselina 0,1 M za odvajanje lužnatih hlapljivih tvari

▼B

Dodatak 3.

PRIMJER BIOMETARSKE APARATURE



▼B

Dodatak 4.

PRIMJER IZRAČUNA DOZE PRIMJENE ZA ISPITNE POSUDE

Unutarnji promjer cilindra:	= 8 cm
Dubina vodenog stupca bez sedimenta:	= 12 cm
Površina: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Količina primjene: 500 g ispitivane tvari/ha odgovara 5 μg/cm^2	
Ukupno μg: 5 × 50,3	= 251,5 μg
Prilagođavanje količine u odnosu na dubinu od 100 cm:	
12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 μg
Volumen vodenog stupca: 50,3 × 12	= 603 ml
Koncentracija u vodi: 30,18 ÷ 603	= 0,050 μg/ml ili 50 μg/l

▼M1

C.25. AEROBNA MINERALIZACIJA U POVRŠINSKOJ VODI – SIMULACIJSKI TEST BIORAZGRADNJE

1. METODA

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG 309 (2004) (1.).

1.1. UVOD

Svrha je ovog testa izmjeriti vremenski tijek biorazgradnje ispitivane tvari koja je prisutna u aerobnoj prirodnoj vodi u niskoj koncentraciji i kvantificirati zapažanja u obliku izraza za kinetičku brzinu. Ovaj simulacijski test je laboratorijski šaržni test protresanjem u tikvici kojim se određuju brzine aerobne biorazgradnje organskih tvari u uzorcima prirodne površinske vode (slatka, bočata ili morska). Temelji se na ISO/DIS 14592-1 (2.), a sadrži i elemente ispitnih metoda C.23. i C.24. (3.) (4.). U slučaju dužih vremena ispitivanja, šaržni postupak može se fakultativno zamijeniti polukontinuiranim kako se ne bi narušio ispitni mikrokozmos. Glavni cilj simulacijskog testa je određivanje mineralizacije ispitivane tvari u površinskoj vodi, koja čini osnovu za opisivanje kinetike razgradnje. Međutim, ispitivanje ima i fakultativni sekundarni cilj – dobivanje informacija o primarnoj razgradnji i tvorbi značajnih proizvoda razgradnje. Utvrđivanje proizvoda pretvorbe i, po mogućnosti, kvantificiranje njihovih koncentracija posebno je važno kod tvari koje se vrlo sporo mineraliziraju (npr. kad vrijeme poluraspada ukupnog preostalog ^{14}C iznosi više od 60 dana). Zbog analitičkih ograničenja, za identifikaciju i kvantifikaciju značajnih proizvoda pretvorbe u pravilu treba koristiti više koncentracije ispitivane tvari (npr. > 100 μg/l).

U okviru ovog testa, niska koncentracija je koncentracija koja je dovoljno niska (npr. manje od 1 μg/l do 100 μg/l) da se prilikom ispitivanja postigne kinetika biorazgradnje kakva se može očekivati u okolišu. Uzimajući u obzir ukupnu masu biorazgradivih ugljičnih supstrata u prirodnoj vodi koja se koristi u ispitivanju, nisko koncentrirana ispitivana tvar služi kao sekundarni supstrat. To znači da je očekivana kinetika biorazgradnje kinetika prvog reda (kinetika „bez rasta”) i da se ispitivana tvar može razgraditi „kometabolizmom”. Kinetika prvog reda podrazumijeva da je brzina razgradnje (mg/l/dan) razmjerna koncentraciji supstrata, koja opada s vremenom. Kod prave kinetike prvog reda konstanta specifične brzine razgradnje (k) je neovisna o vremenu i koncentraciji. Prema tomu, k se ne mijenja značajnije tijekom jednog pokusa, ali ni s povećanjem koncentracije između pokusa. Prema definiciji, konstanta specifične brzine razgradnje jednaka je relativnoj promjeni koncentracije po jedinici vremena: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Iako se u propisanim uvjetima u pravilu očekuje kinetika prvog reda, u određenim su okolnostima možda primjerenije druge vrste kinetike. Odstupanja od kinetike prvog reda mogu se primjerice zapaziti kad brzinu biorazgradnje više ograničava pojava prijenosa mase, npr. brzina difuzije, nego brzina biološke reakcije. Ipak, podaci se gotovo uvijek mogu opisati kinetikom pseudoprvog reda, ako se prihvati konstanta brzine ovisna o koncentraciji.

▼M1

Prije ispitivanja trebale bi biti raspoložive informacije o biorazgradivosti ispitivane tvari pri višim koncentracijama (npr. iz standardnih testova pretraživanja) kao i podaci o abiotičkoj razgradivosti, proizvodima pretvorbe i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima koji mogu pomoći kod planiranja pokusa i tumačenja rezultata. Sposobnost potpune biorazgradnje može se odrediti primjenom ^{14}C obilježene ispitivane tvari i određivanjem fazne razdiobe ^{14}C na kraju ispitivanja. Ako se koristi neobilježena ispitivana tvar, konačna biorazgradnja se može procijeniti samo ako se ispituje viša koncentracija i ako su poznati svi značajni proizvodi razgradnje.

1.2. DEFINICIJE

Primarna biorazgradnja: Promjena strukture kemikalije (pretvorba) djelovanjem mikroorganizama koja rezultira gubitkom kemijskog identiteta.

Funkcionalna biorazgradnja: Promjena strukture kemikalije (pretvorba) djelovanjem mikroorganizama koja rezultira gubitkom određenog svojstva.

Potpuna aerobna biorazgradnja: Razgradnja kemikalije djelovanjem mikroorganizama u prisutnosti kisika na ugljikov dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata (mineralizacija) i stvaranje nove biomase i organskih proizvoda mikrobne biosinteze.

Mineralizacija: Razgradnja kemikalije odnosno organske tvari djelovanjem mikroorganizama u prisutnosti kisika na ugljikov dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata.

Faza prilagodbe („lag” faza): Vrijeme koje je potrebno da se mikroorganizmi koji obavljaju razgradnju prilagode i stupanj biorazgradnje kemikalije odnosno organske tvari dosegne razinu detekcije (npr. 10 % maksimalne teoretske biorazgradnje ili manje, ovisno o točnosti mjerne tehnike), računajući od početka ispitivanja.

Maksimalna biorazgradnja: Stupanj biorazgradnje kemikalije ili organske tvari u okviru ispitivanja, izražen u postotku, iznad kojega se kemikalija odnosno tvar biološki ne razgrađuje tijekom ispitivanja.

Primarni supstrat: Spoj prirodnog ugljika i izvora energije koji osiguravaju rast i održavanje mikrobne biomase.

Sekundarni supstrat: Komponenta supstrata koja je prisutna u tako niskoj koncentraciji da njezinom razgradnjom relevantni mikroorganizmi primaju tek neznatne količine ugljika i energije u odnosu na ugljik i energiju koja se osigurava razgradnjom glavnih komponenti supstrata (primarni supstrati).

Konstanta brzine razgradnje: Konstanta brzine kinetike prvog reda ili pseudoprvog reda k (d^{-1}) kojom se označava brzina procesa razgradnje. U slučaju šaržnih pokusa k se procjenjuje iz početnog dijela krivulje razgradnje dobivene po završetku faze prilagodbe.

▼M1

Vrijeme poluraspada, $t_{1/2}$ (d): Izraz koji se koristi za opisivanje brzine reakcije prvog reda. To je vremenski interval koji odgovara smanjenju koncentracije za faktor 2. Odnos između vremena poluraspada i konstante brzine razgradnje opisan je jednadžbom $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Vrijeme polurazgradnje, DT_{50} (d): Izraz koji se koristi za kvantifikaciju rezultata ispitivanja biorazagradnje. To je vrijeme koje je potrebno da se dosegne 50 %-tna biorazgradnja, uključujući fazu prilagodbe.

Granica detekcije (Limit of Detection, LOD) i granica kvantifikacije (Limit of Quantification, LOQ): Granica detekcije (LOD) je koncentracija tvari ispod koje se tvar više ne može razlikovati od analitičkih artefakata. Granica kvantifikacije (LOQ) je koncentracija tvari ispod koje se koncentracija ne može odrediti s prihvatljivom točnošću.

Otopljeni organski ugljik (DOC): Dio organskog ugljika u uzorku vode koji se ne može ukloniti predviđenim odjeljivanjem faza, npr. 15-minutnim centrifugiranjem na 40 000 ms^{-2} ili membranskom filtracijom s membranama veličine pora 0,2 μm – 0,45 μm.

Ukupna aktivnost organskog ^{14}C (Total Organic ^{14}C Activity, TOA): Ukupna aktivnost ^{14}C povezana s organskim ugljikom.

Aktivnost otopljenog organskog ^{14}C (Dissolved Organic ^{14}C Activity, DOA): Ukupna aktivnost ^{14}C povezana s otopljenim organskim ugljikom.

Aktivnost čestičnog organskog ^{14}C (Particulate Organic ^{14}C Activity, POA): Ukupna aktivnost ^{14}C povezana s organskim ugljikom u česticama.

1.3. PRIMJENJIVOST TESTA

Simulacijski test primjenjiv je u slučaju nehlapljivih i blago hlapljivih organskih tvari koje se ispituju pri niskim koncentracijama. Ako se korise tikvice otvorene prema atmosferi (npr. začepljene vatom), tvari s konstantom Henryjevog zakona ispod cca 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (cca 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) mogu se u praksi smatrati nehlapljivima. Ako se koriste zatvorene tikvice sa zračnim prostorom, mogu se ispitivati i blago hlapljive tvari (s konstantama Henryjevog zakona < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ili < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) bez gubitaka iz ispitnog sustava. Kod stripiranja CO_2 može doći do gubitaka ^{14}C obilježenih tvari ako se ne provedu odgovarajuće mjere predostrožnosti. U takvim je slučajevima ponekad potrebno odvajati CO_2 na unutarnjem alkalijskom apsorberu ili koristiti vanjski apsorberski sustav CO_2 (izravno određivanje $^{14}CO_2$; vidi Dodatak 3.). Za određivanje kinetike biorazgradnje koncentracije ispitivane tvari moraju biti ispod topljivosti u vodi. Ipak, treba imati na umu da vrijednosti topljivosti u vodi koje se navode u literaturi mogu biti znatno više od topljivosti ispitivane tvari u prirodnim vodama. Topljivost izrazito slabo topljivih ispitivanih tvari može se prema želji utvrditi pomoću prirodnih voda koje će se koristiti u ispitivanju.

Metoda se može koristiti za simulaciju biorazgradnje u površinskoj vodi bez grubih čestica (pelagički test) ili u mutnoj površinskoj vodi kakva se npr. može pronaći u blizini sučelja voda/sediment (test sa suspendiranim sedimentom).

▼M1

1.4. NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivanje se provodi u šaržnom postupku inkubiranjem ispitivane tvari s površinskom vodom (pelagički test) ili s površinskom vodom kojoj je dodana suspendirana kruta tvar/sediment u koncentraciji od 0,01 do 1 g/l suhe mase (test sa suspendiranim sedimentom) radi simulacije vodne cjeline sa suspendiranom krutom tvari ili resuspendiranim sedimentom. Koncentracija suspendirane krute tvari/sedimenta u donjem segmentu ovog područja reprezentativna je za većinu površinskih voda. Ispitne se tikvice inkubiraju u mraku na temperaturi okoliša u aerobnim uvjetima, uz mućkanje. Za određivanje kinetike razgradnje koriste se najmanje dvije koncentracije ispitivane tvari. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor 5 do 10 i trebaju predstavljati očekivani raspon koncentracija u okolišu. Maksimalna koncentracija ispitivane tvari ne smije biti viša od 100 μg/l, a poželjno je da maksimalne ispitne koncentracije budu i niže od 10 μg/l kako bi se zajamčila biorazgradnja u skladu s kinetikom prvog reda. Najniža koncentracija ne smije biti viša od 10 μg/l, a prednost treba dati ispitnim koncentracijama od 1 – 2 μg/l ili čak ispod 1 μg/l. U pravilu se i tako niske koncentracije mogu dovoljno dobro analizirati primjenom ^{14}C obilježenih tvari koje su dostupne na tržištu. Ako se ispitivana tvar primjenjuje u koncentraciji ≤ 100 μg/l, njezinu koncentraciju često nije moguće izmjeriti s potrebnom točnošću zbog analitičkih ograničenja (vidi odjeljak 1.7.2. stavak 2.). Više koncentracije ispitivane tvari (> 100 μg/l, a ponekad i 1 mg/l) mogu se koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju značajnih proizvoda pretvorbe te u slučajevima kad nije raspoloživa specifična analitička metoda s niskom granicom detekcije. Ako se ispituju visoke koncentracije ispitivane tvari, ponekad nije moguće procijeniti konstantu razgradnje prvog reda i vrijeme poluraspada na temelju dobivenih rezultata budući da razgradnja vjerojatno neće slijediti kinetiku prvog reda.

Razgradnja se prati mjerenjem preostalog ^{14}C ili preostale koncentracije ispitivane tvari, ako se provodi specifična kemijska analiza, u odgovarajućim vremenskim razmacima. ^{14}C obilježavanjem najstabilnijeg dijela molekule može se odrediti ukupna mineralizacija, dok se ^{14}C obilježavanjem manje stabilnog dijela molekule i primjenom specifične analize može odrediti samo primarna biorazgradnja. Ipak, najstabilniji dio ne mora nužno uključivati relevantni funkcionalni dio molekule (koji je povezan sa specifičnim svojstvom, kao što je toksičnost, bioakumulacija itd.). U tom je slučaju kod ispitivanja možda primjerenije koristiti tvar s ^{14}C oznakom u funkcionalnom dijelu kako bi se moglo pratiti nestajanje specifičnog svojstva.

1.5. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

Za ovaj se test mogu koristiti radioaktivno obilježene i neobilježene tvari. ^{14}C obilježavanje je preporučeni postupak, a oznaka se u pravilu treba nalaziti na najstabilnijem dijelu ili dijelovima molekule (vidi također odjeljak 1.4.). Kod tvari koje sadrže više od jednog aromatskog prstena treba po mogućnosti obilježiti jedan ili više ugljika u svakom prstenu. Osim toga, poželjno je obilježiti jedan ili više ugljika s obje strane lako razgradivih veza. Kemijska i/ili radioaktivna čistoća ispitivane tvari treba biti > 95 %. Kod radioaktivno obilježenih tvari poželjna je specifična aktivnost od približno 50 μCi/mg (1,85 MBq) ili više da bi se olakšala mjerenja ^{14}C kod ispitivanja s niskim početnim koncentracijama. Trebaju biti raspoložive sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

▼M1

— topljivost u vodi (metoda A.6.),

— topljivost u organskom otapalu ili otapalima (ako se tvar primjenjuje pomoću otapala ili ima nisku topljivost u vodi),

— konstanta disocijacije (pKa), ako je tvar sklona protonaciji ili deprotonaciji (OECD TG 112) (5.),

— tlak pare (metoda A.4.) i konstanta Henryjevog zakona,

— kemijska stabilnost u vodi i u mraku (hidroliza) (metoda C.7.).

Ako se tvari koje su slabo topljive u vodi ispituju u morskoj vodi, korisno je znati konstantu isoljivanja (ili „Setschenowu konstantu”) K^s, koja se definira izrazom: $\log (S/S') = K^s C_m$, gdje su S i S' topljivost tvari u slatkoj i morskoj vodi i C_m je molarna koncentracija soli.

Ako se ispitivanje provodi kao „test sa suspendiranim sedimentom”, moraju biti raspoložive i ove informacije:

— podjelni koeficijent n-oktanol/voda (metoda A.8.),

— koeficijent adsorpcije (metoda C.18.).

Ostale korisne informacije su:

— koncentracija u okolišu, ako je poznata ili procijenjena,

— toksičnost ispitivane tvari za mikroorganizme (metoda C.11.),

— laka i/ili svojstvena biorazgradivost (metoda C.4. A-F, C.12., C.9, OECD TG 302 (5.)),

— aerobna ili anaerobna biorazgradivost u tlu i studije pretvorbe u sedimentu/vodi (metoda C.23., C.24.).

1.6. REFERENTNE TVARI

Kao referentnu tvar treba koristiti tvar koja se u pravilu lako razgrađuje u aerobnim uvjetima (npr. anilin ili natrijev benzoat). Očekivano vrijeme razgradnje anilina i natrijevog benzoata uglavnom je kraće od 2 tjedna. Svrha korištenja referentnih tvari je uvjeriti se da se mikrobna aktivnost ispitne vode kreće unutar određenih granica, tj. da voda sadrži aktivnu mikrobnu populaciju.

▼M1

1.7. KRITERIJI KAKVOĆE

1.7.1. **Iskorištenje**

Svaka početna ispitna koncentracija provjerava se odmah nakon dodavanja ispitivane tvari u najmanje dva uzorka mjerenjem aktivnosti ^{14}C ili, u slučaju neobilježenih tvari, kemijskom analizom. Time se dobivaju informacije o primjenjivosti i ponovljivosti metode analize i homogenosti razdiobe ispitivane tvari. Kod kasnijih analiza podataka u pravilu se ne koristi nazivna koncentracija već izmjerena početna aktivnost ^{14}C odnosno izmjerena koncentracija ispitivane tvari, jer se time ispravljaju gubici zbog sorpcije i greške u doziranju. Kod ^{14}C obilježenih tvari iskorištenje na kraju pokusa proizlazi iz bilance mase (vidi zadnji stavak odjeljka 1.8.9.4.). U idealnom slučaju bilanca mase radioaktivno obilježene tvari trebala bi se kretati u području od 90 % do 110 %, dok bi analitička točnost kod neobilježenih tvari trebala biti takva da se dobije početno iskorištenje u području od 70 % do 110 %. Ta područja treba shvatiti kao ciljne vrijednosti, a ne kao kriterij za prihvaćanje ispitivanja. Analitička točnost može se fakultativno odrediti pri koncentraciji ispitivane tvari koja je niža od početne kao i za značajne proizvode pretvorbe.

1.7.2. **Ponovljivost i osjetljivost metode analize**

Ponovljivost metode analize (uključujući učinkovitost početne ekstrakcije) za kvantifikaciju ispitivane tvari i proizvoda pretvorbe (prema potrebi) treba provjeriti peterostrukom analizom pojedinačnih ekstrakata površinske vode.

Granica detekcije (LOD) metode analize za ispitivanu tvar i proizvode pretvorbe treba po mogućnosti biti najmanje 1 % početne količine koja je primijenjena na ispitni sustav. Granica kvantifikacije (LOQ) treba biti jednaka ili manja od 10 % primijenjene koncentracije. Za kemijsku analiza brojnih organskih tvari i njihovih proizvoda pretvorbe često su potrebne relativno visoke koncentracije ispitivane tvari tj. > 100 μg/l.

1.8. OPIS ISPITNE METODE

1.8.1. **Oprema**

Ispitivanje se može provesti u stožastim ili cilindričnim tikvicama odgovarajuće zapremine (npr. 0,5 ili 1,0 l) sa silikonskim ili gumenim čepovima ili u serumskim bocama s poklopcima koji ne propuštaju CO_2 (npr. sa zatvaračem od butilne gume). Druga je mogućnost da se upotrijebi veći broj tikvica i u svakom vremenu uzorkovanja uzimaju čitave tikvice, najmanje po dvije, (vidi zadnji stavak odjeljka 1.8.9.1.). Kod nehlapljivih ispitivanih tvari koje nisu radioaktivno obilježene nisu potrebni plinonepropusni čepovi i poklopci; dovoljno ih je začepiti vatom koja sprečava onečišćenje iz zraka (vidi stavak 2. odjeljka 1.8.9.1.). Blago hlapljive tvari treba ispitati u sustavu biometarskog tipa uz nježno miješanje po površini vode. Da bi se izbjeglo onečišćenje bakterijama, posude se mogu prije uporabe sterilizirati zagrijavanjem ili obradom u autoklavu. Osim toga, koristi se sljedeća standardna laboratorijska oprema:

— tresilica ili magnetski mješači za neprekidno mućkanje ispitnih posuda,

▼M1

— centrifuga,

— mjerač pH vrijednosti,

— turbidimetar za nefelometrijska mjerenja mutnoće,

— peć ili mikrovalna peć za određivanje suhe mase,

— uređaj za membransku filtraciju,

— autoklav ili peć za toplinsku sterilizaciju staklene opreme,

— oprema za rukovanje ^{14}C obilježenim tvarima,

— oprema za kvantifikaciju aktivnosti ^{14}C u uzorcima iz otopina za odvajanje CO_2 i, prema potrebi, iz uzoraka sedimenta,

— analitička oprema za određivanje ispitivane (i referentne) tvari, ako se koristi specifična kemijska analiza (npr. plinski kromatograf, visokotlačni tekućinski kromatograf).

1.8.2. **Radne otopine ispitivane tvari**

Za pripremu radnih otopina ispitivanih i referentnih tvari treba koristiti deioniziranu vodu (vidi odjeljak 1.8.7. stavak 1.). U deioniziranoj vodi ne smije biti tvari koje bi mogle biti toksične za mikroorganizme, a udio otopljenog organskog ugljika (DOC) ne smije biti viši od 1 mg/l (6.).

1.8.3. **Skupljanje i prijevoz površinske vode**

Mjesto za uzorkovanje površinske vode treba odabrati u skladu sa svrhom ispitivanja. Kod odabira mjesta treba uzeti u obzir moguću povijest unosa materijala iz poljoprivrede, industrije i kućanstava. Voda za ispitivanje ne smije se skupljati na mjestima za koja se zna da su u prethodne četiri godine onečišćena ispitivanom tvari ili njezinim strukturnim analozima, osim ako je svrha istraživanja ispitati brzinu razgradnje na onečišćenim lokacijama. Na mjestu uzorkovanja treba izmjeriti pH vrijednost i temperaturu vode. Osim toga, treba zabilježiti dubinu uzorkovanja i izgled vodenog uzorka (npr. boja i mutnoća) (vidi odjeljak 3.). Da bi se dokazali aerobni uvjeti, treba izmjeriti koncentraciju kisika i/ili redoks potencijal u vodi i površinskom sloju sedimenta, osim ako je to nedvojbeno s obzirom na izgled i ranija iskustva s lokacijom. Površinsku vodu treba prenositi u temeljito očišćenim spremnicima. Za to vrijeme temperatura uzorka ne smije biti značajno viša od ispitne temperature. Ako prijevoz traje dulje od 2 do 3 sata, preporučuje se hlađenje na 4 °C. Vodeni uzorak ne smije biti zamrznut.

▼M1

1.8.4. **Skladištenje i priprema površinske vode**

Ispitivanje po mogućnosti treba započeti u roku od jednoga dana od uzimanja uzorka. Skladištenje vode, ako je ono potrebno, treba svesti na najmanju moguću mjeru, a u svakom slučaju ne smije trajati duže od 4 tjedna. Vodeni uzorak treba do uporabe držati na temperaturi od 4 °C uz dozračivanje. Prije uporabe treba ukloniti krupne čestice npr. filtriranjem kroz najlonski filtar veličine otvora 100 μm ili kroz grubi filtar-papir ili taloženjem.

1.8.5. **Priprema vode sa sedimentom (fakultativno)**

Kod testa sa suspendiranim sedimentom treba pripremiti suspenziju dodavanjem površinskog sedimenta u tikvice koje sadrže prirodnu vodu (koja je prethodno filtrirana radi uklanjanja krupnih čestica, kako je opisano u odjeljku 1.8.4.); koncentracija suspendirane krute tvari treba biti između 0,01 i 1 g/l. Površinski sediment mora potjecati s istog mjesta kao vodeni uzorak. Ovisno o vodnom okolišu, površinski sediment može imati visok sadržaj organskog ugljika (2,5 – 7,5 %) i finu teksturu ili nizak sadržaj organskog ugljika (0,5 – 2,5 %) i grubu teksturu (3.). Površinski se sediment može pripremiti na sljedeći način: uz pomoć prozirne plastične cjevčice izvuče se nekoliko sedimentnih jezgri; odmah nakon uzorkovanja odrežu se gornji aerobni slojevi (od površine do dubine od najviše 5 mm) i združe. Dobiveni uzorak sedimenta prenosi se u posudi s velikim zračnim prostorom kako bi se osigurali aerobni uvjeti (uz hlađenje na 4 °C ako prijevoz traje više od 2 – 3 sata). Uzorak sedimenta se suspendira u ispitnoj vodi u omjeru 1: 10 i drži do uporabe na temperaturi od 4 °C uz dozračivanje. Skladištenje sedimenta, ako je ono potrebno, treba svesti na najmanju moguću mjeru, a u svakom slučaju ne smije trajati duže od 4 tjedna.

1.8.6. **Polukontinuirani postupak (fakultativno)**

Inkubaciju je ponekad potrebno produžiti (na nekoliko mjeseci) ako se značajna razgradnja ispitivane tvari izmjeri tek nakon dugog vremena prilagodbe. Ako je to poznato iz ranijeg ispitivanja tvari, ispitivanje se može započeti polukontinuiranim postupkom, koji omogućuje periodičko obnavljanje dijela ispitne vode odnosno suspenzije (vidi Dodatak 2.). Druga je mogućnost da se uobičajeni šaržni test pretvori u polukontinuirani ako tijekom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane tvari (vidi odjeljak 1.8.8.3. stavak 2.).

1.8.7. **Dodavanje ispitivane (ili referentne) tvari**

U slučaju tvari visoke topljivosti u vodi (> 1 mg/l) i niske hlaplji-vosti (konstanta Henryjevog zakona < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ ili < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), može se pripremiti radna otopina u deioniziranoj vodi (vidi odjeljak 1.8.2.); u ispitne se posude doda odgovarajući volumen radne otopine da bi se dobila željena koncentracija. Volumen radne otopine koja se dodaje u posudu treba svesti na najmanju moguću mjeru (po mogućnosti < 10 % konačnog volumena tekućine). Druga mogućnost je da se ispitivana tvar otopi u većem volumenu ispitne vode, što se može smatrati zamjenom za korištenje organskih otapala.

▼M1

Ako kod pripreme radnih otopina nehlapljivih tvari koje su slabo topljive u vodi nije moguće izbjeći primjenu otapala, treba koristiti hlapljiva organska otapala, s time da količina otapala koja se unosi u ispitni sustav ne smije biti viša od 1 % v/v i ne smije imati štetni učinak na mikrobnu aktivnost. Otapalo ne smije utjecati na stabilnost ispitivane tvari u vodi. Otapalo treba stripirati na najmanju moguću količinu kako ne bi došlo do značajnog povećanja koncentracije DOC-a u ispitnoj vodi odnosno suspenziji. To treba provjeriti specifičnom analizom tvari odnosno, ukoliko je to moguće, analizom DOC-a (6.). Treba paziti da se prenesena količina otapala svede na nužnu mjeru i uvjeriti se da se prisutna količina ispitivane tvari može otopiti u konačnom volumenu ispitne vode. Mogu se koristiti i druge tehnike za uvođenje ispitivane tvari u ispitne posude, kako je opisano u (7.) i (8.). Ako se za primjenu ispitivane tvari koristi organsko otapalo, treba uvesti kontrole s otapalom koje sadrže ispitnu vodu (bez dodataka) i ispitnu vodu s referentnom tvari i s njima postupati na sličan način kao s aktivnim ispitnim posudama u koje je dodana ispitivana tvar u otapalu kao nosaču. Svrha kontrola s otapalom je ispitati moguće štetne učinke otapala na mikrobnu populaciju na temelju razgradnje referentne tvari.

1.8.8. **Ispitni uvjeti**

1.8.8.1. *Ispitna temperatura*

Inkubacija se provodi u mraku (poželjno) ili pod difuznom rasvjetom na kontroliranoj temperaturi (± 2 °C), koja može odgovarati temperaturi na terenu ili standardnoj temperaturi od 20 – 25 °C. Temperatura na terenu može biti stvarna temperatura uzorka u trenutku uzorkovanja ili prosječna temperatura na mjestu uzorkovanja.

1.8.8.2. *Mućkanje*

Čestice i mikroorganizme treba držati u suspenziji neprekidnim mućkanjem tj. tresenjem ili miješanjem. Mućkanjem se također olakšava prijenos kisika iz zračnog prostora u tekućinu i tako osiguravaju potrebni aerobni uvjeti. Tikvice se stave na tresilicu (cca 100 o/min) ili se koristi magnetska mješalica. Mućkanje se ne smije prekidati. Tresenje odnosno miješanje mora biti što je moguće nježnije, ali istovremeno treba voditi računa da se održi homogenost suspenzije.

1.8.8.3. *Trajanje ispitivanja*

Ispitivanje uglavnom ne bi smjelo trajati duže od 60 dana, osim ako se primjenjuje polukontinuirani postupak s periodičkim obnavljanjem ispitne suspenzije (vidi odjeljak 1.8.6. i Dodatak 2.). Ipak, vrijeme ispitivanja se i kod primjene šaržnog postupka može produžiti do najviše 90 dana ako je razgradnja ispitivane tvari započela unutar prvih 60 dana. Razgradnja se prati u odgovarajućim vremenskim razmacima određivanjem preostale aktivnosti ^{14}C odnosno nastalog $^{14}CO_2$ (vidi odjeljak 1.8.9.4.) i/ili kemijskom analizom (odjeljak 1.8.9.5.). Vrijeme inkubacije mora biti dovoljno dugo da se ocijeni proces razgradnje. Poželjno je da stupanj razgradnje bude viši od 50 %; kod tvari koje se sporo razgrađuju stupanj razgradnje mora biti dovoljan (u pravilu iznad 20 %) da se može procijeniti konstanta kinetičke brzine razgradnje.

▼M1

Provode se periodička mjerenja pH vrijednosti i koncentracije kisika u ispitnom sustavu, osim ako zahvaljujući ranijim iskustvima s uzorcima vode i sedimenta s iste lokacije u sličnim ispitivanjima takva mjerenja nisu potrebna. U određenim uvjetima zbog metabolizma primarnih supstrata, koji mogu biti prisutni u vodi ili sedimentu u znatno višim koncentracijama, može doći do stvaranja povećanih količina CO_2 i povećane potrošnje kisika, što može izazvati značajne promjene pokusnih uvjeta tijekom ispitivanja.

1.8.9. **Postupak**

1.8.9.1. *Priprema tikvica za pelagički test*

U ispitne se tikvice stavi prikladna količina ispitivane tvari koja je otprilike dovoljna da se ispuni jedna trećina zapremine tikvice, ali ne manje od cca 100 ml. I ako se koristi veći broj tikvica (kako bi se u svakom vremenu uzorkovanja mogle uzimati čitave tikvice), potrebno je oko 100 ml ispitne vode, budući da male veličine uzorka mogu utjecati na duljinu faze prilagodbe. Ispitivana se tvar dodaje putem radne otopine kako je opisano u odjeljku 1.8.2. i 1.8.7. Da bi se mogla odrediti kinetika razgradnje i izračunati konstanta kinetičke brzine razgradnje, potrebne su najmanje dvije koncentracije ispitivane tvari koje se razlikuju za faktor 5 do 10. Obje odabrane koncentracije moraju biti manje od 100 μg/l, a poželjno je da budu u rasponu od < 1 – 10 μg/l.

Tikvice se zatvore čepovima ili poklopcima koji propuštaju zrak i CO_2. Ako se ispituju nehlapljive kemikalije koje nisu radioaktivno obilježene, posude se mogu začepiti vatom koja sprečava onečišćenje iz zraka (vidi odjeljak 1.8.1.), pod uvjetom da se zna da su svi značajni proizvodi razgradnje nehlapljivi i primjenjuje se neizravno određivanje CO_2 (vidi Dodatak 3.).

Tikvice se inkubiraju na odabranoj temperaturi (vidi odjeljak 1.8.8.1.). Uzorci se uzimaju na kemijsku analizu ili mjerenje ^{14}C na početku ispitivanja (tj. prije nego što započne razgradnja; vidi odjeljak 1.7.1.) i u odgovarajućim vremenskim razmacima tijekom ispitivanja. Uzorkovanje se može obaviti izvlačenjem poduzoraka (npr. alikvoti od 5 ml) iz svakog ponavljanja ili uzimanjem čitavih tikvica u svakom vremenu uzorkovanja. Mineralizacija ispitivane tvari može se odrediti neizravno ili izravno (vidi Dodatak 3.). Obično je za pouzdanu procjenu konstante brzine potrebno najmanje pet točaka uzorkovanja u fazi razgradnje (tj. nakon završetka faze prilagodbe), osim u slučaju brzo razgradivih tvari, kada se uz odgovarajuće obrazloženje mogu dopustiti i tri točke uzorkovanja. Kod tvari koje nisu brzo razgradive, u fazi razgradnje se bez problema može obaviti više mjerenja i stoga za procjenu k treba koristiti više točaka podataka. Nije moguće navesti točan vremenski raspored uzorkovanja budući da su brzine biorazgradnje različite; ipak, preporučuje se da se u slučaju spore razgradnje uzorkovanje provodi jedanput tjedno. Ako se ispitivana tvar brzo razgrađuje, uzorkovanje treba obavljati jedanput dnevno u prva tri dana, a zatim svaki drugi ili treći dan. U određenim okolnostima, npr. kod tvari koje vrlo brzo hidroliziraju, ponekad je potrebno uzimati uzorke svaki sat. Preporučuje se da se prije ispitivanja provede preliminarno istraživanje kako bi se odredili prikladni intervali uzorkovanja. Ako se uzorci moraju sačuvati za daljnju specifičnu analizu, preporučljivo je uzeti više uzoraka i zatim na kraju pokusa odabrati one koji će se analizirati obrnutim redoslijedom tj. prvo se analiziraju uzorci koji su uzeti zadnji (za smjernice o stabilnosti uzoraka tijekom skladištenja vidi odjeljak 1.8.9.5. stavak 2.).

▼**M1**

1.8.9.2. *Broj tikvica i uzoraka*

Pripremi se dovoljan broj ispitnih tikvica tako da se dobije:

— ispitne tikvice; najmanje dvije tikvice za svaku koncentraciju ispitivane tvari (poželjno je najmanje 3) ili veći broj ispitnih tikvica po koncentraciji, ako se u svakom vremenu uzorkovanja uzimaju čitave tikvice (označene kao F_T);

— ispitne tikvice za izračunavanje bilance mase; najmanje dvije tikvice za svaku ispitnu koncentraciju (označene kao F_M);

— slijepa proba, bez ispitivane tvari; najmanje jedna tikvica za slijepu probu koja sadrži samo ispitnu vodu (označena kao F_B);

— kontrola s referentnom tvari; dvije tikvice s referentnom tvari (npr. anilin ili natrijev benzoat, 10 µg/l) (označene kao F_C). Svrha kontrole s referentnom tvari je potvrditi minimalnu mikrobnu aktivnost. Ako je to praktično, može se koristiti radioaktivno obilježena referentna tvar, također i onda kad se razgradnja ispitivane tvari prati kemijskim analizama;

— sterilna kontrola; jedna ili dvije tikvice koje sadrže steriliziranu ispitnu vodu radi provjere moguće abiotičke razgradnje ili drugog nebiološkog uklanjanja ispitivane tvari (označene kao F_S). Biološka se aktivnost može prekinuti obradom ispitne vode u autoklavu (121 °C; 20 min), dodavanjem toksične tvari (npr. natrijev azid (NaN_3) u koncentraciji 10 – 20 g/l, živin klorid ($HgCl_2$) u koncentraciji 100 mg/l ili formalin u koncentraciji 100 mg/l) ili gama zračenjem. Ako se koristi $HgCl_2$, on se mora zbrinuti kao toksični otpad. U vodi u koju je dodana velika količina sedimenta nije lako postići sterilne uvjete; u tom se slučaju preporučuje višekratna obrada u autoklavu (npr. tri puta). Treba uzeti u obzir da se sorpcijska svojstva sedimenta mogu promijeniti obradom u autoklavu;

— kontrole s otapalom, koje sadrže ispitnu vodu i ispitnu vodu s referentnom tvari; po dvije tikvice koje su obrađene istom količinom otapala uz primjenu istog postupka kao u slučaju ispitivane tvari. Svrha ove kontrole je ispitati moguće štetne učinke otapala određivanjem razgradnje referentne tvari.

Kod planiranja ispitivanja treba uzeti u obzir relativnu važnost povećanog broja ponavljanja u odnosu na povećani broj uzorkovanja. Točan broj tikvica ovisi o metodi mjerenja razgradnje (vidi odjeljak 1.8.9.1. stavak 3., odjeljak 1.8.9.4. i Dodatak 3.).

▼M1

U svakom vremenu uzorkovanja treba iz svake ispitne tikvice uzeti po dva poduzorka (npr. alikvoti od 5 ml). Ako se koristi veći broj tikvica radi uzorkovanja čitavih tikvica, u svakom vremenu uzorkovanja treba uzeti najmanje dvije tikvice (vidi odjeljak 1.8.9.1. stavak 1.).

1.8.9.3. *Priprema tikvica za test sa suspendiranim sedimentom (fakultativno)*

U ispitne se posude dodaju potrebni volumeni ispitne vode i sedimenta (prema potrebi, vidi odjeljak 1.8.5.). Priprema tikvica za test sa suspendiranim sedimentom je ista kao kod pelagičkog testa (vidi odjeljke 1.8.9.1. i 1.8.9.2.). Poželjno je koristiti serumske boce ili tikvice sličnog oblika. Zatvorene tikvice polažu se vodoravno na tresilicu. Naravno, otvorene tikvice za nehlapljive tvari koje nisu radioaktivno obilježene treba staviti u uspravan položaj; u ovom se slučaju preporučuje korištenje magnetske mješalice s mješačima obloženim staklom. Boce prema potrebi treba dozračivati kako bi se održali porebni aerobni uvjeti.

1.8.9.4. *Radiokemijska određivanja*

Nastali $^{14}CO_2$ mjeri se neizravno i izravno (vidi Dodatak 3.). Neizravno određivanje $^{14}CO_2$ temelji se na razlici između početne aktivnosti ^{14}C u ispitnoj vodi odnosno suspenziji i ukupne preostale aktivnosti u vremenu uzorkovanja, koja se mjeri nakon zakiseljavanja uzorka na pH 2 – 3 i stripiranja CO_2. Time je anorganski ugljik uklonjen i preostala izmjerena aktivnost potječe od organskog materijala. Neizravno određivanje $^{14}CO_2$ ne treba koristiti ako pretvorbom ispitivane tvari nastaju značajni hlapljivi proizvodi (vidi Dodatak 3.). Nastajanje $^{14}CO_2$ treba po mogućnosti izravno mjeriti (vidi Dodatak 3.) u najmanje jednoj ispitnoj tikvici u svakom vremenu uzorkovanja; taj postupak omogućuje da se provjeri i bilanca mase i proces biorazgradnje, ali je ograničen na ispitivanja koja se provode sa zatvorenim tikvicama.

Ako se nastali $^{14}CO_2$ izravno mjeri tijekom ispitivanja, na početku ispitivanja treba pripremiti veći broj tikvica. Izravno određivanje $^{14}CO_2$ preporučuje se ako pretvorbom ispitivane tvari nastaju značajni hlapljivi proizvodi. Dodatne ispitne tikvice se u svakoj točki mjerenja zakisele na pH 2 – 3 i $^{14}CO_2$ skuplja na unutarnjem ili vanjskom apsorberu (vidi Dodatak 3.).

Koncentracije ^{14}C obilježene ispitivane tvari i značajnih proizvoda pretvorbe mogu se fakultativno odrediti primjenom radiokromatografije (npr. tankoslojna kromatografija, RAD-TLC) ili HPLC-a s radiokemijskom detekcijom.

Isto tako, može se odrediti fazna razdioba preostale radioaktivnosti (vidi Dodatak 1.) te preostala ispitivana tvar i proizvodi pretvorbe.

▼M1

Na kraju ispitivanja treba odrediti bilancu mase izravnim mjerenjem $^{14}CO_2$ na zasebnim ispitnim tikvicama iz kojih se ne uzimaju uzorci tijekom ispitivanja (vidi Dodatak 3.).

1.8.9.5. *Specifična kemijska analiza*

Ako je raspoloživa osjetljiva metoda za specifičnu kemijsku analizu, primarna biorazgradnja može se ocijeniti bez radioaktivnog obilježavanja mjerenjem ukupne preostale koncentracije ispitivane tvari. Ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana tvar (za mjerenje ukupne mineralizacije), specifična kemijska analiza se može paralelno provoditi da bi se dobile dodatne informacije i provjerio postupak. Osim toga, specifičnom kemijskom analizom mogu se mjeriti proizvodi pretvorbe nastali razgradnjom ispitivane tvari, a to se u svakom slučaju preporučuje u slučaju tvari koje se mineraliziraju s vremenom poluraspada iznad 60 dana. U svakom vremenu uzorkovanja treba izmjeriti i dokumentirati koncentraciju ispitivane tvari i proizvode pretvorbe (kao koncentraciju i kao postotak primijenjene koncentracije). U pravilu je u svakom vremenu uzorkovanja potrebno identificirati proizvode pretvorbe koji su utvrđeni na razini ≥ 10 % primijenjene koncentracije, osim ako postoje opravdani razlozi da se to ne učini. Također treba razmisliti o identifikaciji proizvoda pretvorbe čije se koncentracije stalno povećavaju tijekom istraživanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze gore spomenuti prag, jer to može ukazivati na postojanost. Ako se smatra da bi moglo doći do brze abiotičke pretvorbe ispitivane tvari (npr. hidroliza), treba razmisliti o analiziranju proizvoda pretvorbe u sterilnim kontrolama. O kvantifikaciji i identifikaciji proizvoda pretvorbe treba odlučiti za svaki slučaj posebno i u izvješću navesti odgovarajuće obrazloženje. Postupci ekstrakcije organskim otapalom primjenjuju se u skladu s uputama danim u odgovarajućoj analitičkoj metodi.

Sve uzorke treba skladištiti na temperaturi od 2 do 4 °C bez pristupa zraka, ako će se analiza obaviti u roku od 24 sata (poželjno). Kod dužeg skladištenja uzorke treba zamrznuti ispod – 18 °C ili kemijski konzervirati. Konzerviranje uzoraka zakiseljavanjem se ne preporučuje jer zakiseljeni uzorci mogu biti nestabilni. Ako se uzorci neće analizirati u roku od 24 sata i moraju se duže skladištiti, treba provesti istraživanje stabilnosti u uvjetima skladištenja kako bi se dokazala stabilnost kemikalija u pitanju na temperaturama ispod – 18 °C odnosno u uvjetima konzerviranja. Ako analitička metoda uključuje ekstrakciju otapalom ili ekstrakciju krute faze (SPE), ekstrakciju treba obaviti neposredno nakon uzorkovanja ili nakon hladnog skladištenja u trajanju od najviše 24 sata.

Ovisno o osjetljivosti metode analize, ponekad su potrebni veći volumeni uzoraka od onih koji su navedeni u odjeljku 1.8.1. Ispitivanje se bez problema može obaviti s ispitnim volumenima od jedne litre u tikvicama od 2 – 3 litre, što omogućuje uzimanje uzoraka od cca 100 ml.

▼M1

2. **PODACI I IZVJEŠĆIVANJE**

2.1. OBRADA REZULTATA

2.1.1. **Grafički prikaz podataka**

Vremena uzorkovanja treba zaokružiti na cijeli broj sati (osim ako se tvar značajno razgrađuje u nekoliko minuta ili sati), ali ne i na cijeli broj dana. Napravi se linearni i polulogaritamski prikaz procijenjenih vrijednosti preostale aktivnosti ispitivane tvari (za ^{14}C obilježene tvari) odnosno preostale koncentracije (za neobilježene tvari) u ovisnosti o vremenu (vidi sliku 1.a i 1.b). Ako je došlo do razgradnje, rezultati tikvica F_T se usporede s rezultatima tikvica F_S. Ako se srednje vrijednosti rezultata tikvica s ispitivanom tvari (F_T) i sterilnih tikvica (F_S) razlikuju za manje od 10 %, može se pretpostaviti da je zapažena razgradnja pretežito abiotička. Ako je razgradnja u tikvicama F_S manja, dobivene brojke se mogu upotrijebiti za ispravak rezultata tikvica F_T (oduzimanjem) i procjenu stupnja biorazgradnje. Ako se provode fakultativne analize značajnih proizvoda pretvorbe, osim grafičkog prikaza opadanja ispitivane tvari treba prikazati tvorbu i opadanje proizvoda pretvorbe.

Trajanje faze prilagodbe t_L procijeni se iz krivulje razgradnje (polulogaritamski prikaz) ekstrapolacijom linearnog dijela krivulje do nulte razgradnje ili, kao druga mogućnost, određivanjem vremena koje je potrebno da se postigne približno 10 %-tna razgradnja (vidi sliku 1.a i 1.b). Iz polulogaritamskoga grafa procijeni se konstanta brzine prvog reda k i njezina standardna greška linearnom regresijom ln (preostala aktivnost ^{14}C ili koncentracija ispitivane tvari) u ovisnosti o vremenu. Posebice kad su u pitanju mjerenja ^{14}C treba koristiti samo podatke iz početnog linearnog dijela krivulje po završetku faze prilagodbe; pritom treba radije odabrati manje reprezentativnih podataka nego veći broj nesigurnijih podataka. U ovom smislu nesigurnost uključuje i greške vezane uz preporučeno izravno korištenje izmjerenih vrijednosti preostale aktivnosti ^{14}C (vidi u nastavku). Ponekad je relevantno izračunati dvije različite konstante brzine ako se razgradnja odvija u dvije faze. Za to je potrebno definirati dvije različite faze krivulje razgradnje. Ako se uzimaju uzorci iz iste tikvice, konstantu brzine k i vrijeme poluraspada $t_{1/2} = \ln 2/k$ treba izračunati za svaku pojedinačnu tikvicu, dok se u slučaju uzorkovanja čitavih tikvica za izračun koriste prosječne vrijednosti (vidi zadnji stavak odjeljka 1.8.9.2.). Ako se koristi prvi postupak, konstantu brzine i vrijeme poluraspada treba navesti zasebno za svaku pojedinačnu tikvicu i kao prosječnu vrijednost sa standardnom greškom. Ako se koriste visoke koncentracije ispitivane tvari, krivulja razgradnje može znatno odstupati od pravca (polulogaritamski graf) i možda neće vrijediti kinetika prvog reda. U tom slučaju nema smisla određivati vrijeme poluraspada. Međutim, za ograničeni raspon podataka moguće je primijeniti kinetiku pseudo-prvog reda i procijeniti vrijeme polurazgradnje DT_{50} (vrijeme potrebno da se postigne 50 %-tna razgradnja). Pritom ipak treba imati na umu da na temelju tog DT_{50} nije moguće predvidjeti vremenski tijek razgradnje izvan odabranog raspona podataka jer se radi o vrijednosti koja opisuje samo određeni skup podataka. Analitički alati koji olakšavaju statističke izračune i prilagođavanje krivulja su lako dostupni te se stoga preporučuje korištenje takvog softvera.

▼M1

Ako se provode specifične kemijske analize, treba procijeniti konstante brzine i vremena poluraspada za primarnu razgradnju na način kako je je gore opisano za ukupnu mineralizaciju. Ako je primarna razgradnja ograničavajući proces, ponekad se mogu koristiti točke podataka iz čitavog tijeka razgradnje. To je stoga što se ovdje provode izravna mjerenja za razliku od mjerenja aktivnosti ^{14}C.

Ako se koriste ^{14}C obilježene tvari, bilancu mase treba izraziti u postotku primijenjene početne koncentracije barem na kraju ispitivanja.

2.1.2. **Preostala aktivnost**

Kad se ^{14}C obilježeni dio organske tvari biološki razgrađuje, najveći dio ^{14}C pretvara se u $^{14}CO_2$, dok se drugi dio troši na rast biomase i/ili sintezu izvanstaničnih metabolita. Prema tomu, „potpuna" biorazgradnja tvari ne rezultira 100 %-tnom pretvorbom njezinog ugljika u $^{14}CO_2$. ^{14}C ugrađen u proizvode biosinteze kasnije se polako oslobađa kao $^{14}CO_2$ zbog „sekundarne mineralizacije". Iz tog su razloga na grafičkim prikazima preostale aktivnosti organskog ^{14}C (izmjerene nakon stripiranja CO_2) odnosno nastalog $^{14}CO_2$ u ovisnosti o vremenu vidljivi „repovi" po završetku razgradnje. To kompliciira kinetičko tumačenje podataka i stoga za procjenu konstante brzine razgradnje u pravilu treba koristiti samo početni dio krivulje (po završetku faze prilagodbe, a prije nego što se postigne približno 50 %-tna razgradnja). Ako se ispitivana tvar razgrađuje, ukupna preostala aktivnost organskog ^{14}C je uvijek viša od aktivnosti ^{14}C povezane s preostalom nepromijenjenom ispitivanom tvari. Ako se ispitivana tvar razgrađuje reakcijom prvog reda i ako se stalni udio (α) mineralizira u CO_2, početni nagib krivulje nestajanja ^{14}C (ukupni organski ^{14}C u vremenu) je α puta nagib odgovarajuće krivulje za koncentraciju ispitivane tvari (ili točnije ^{14}C obilježenog dijela ispitivane tvari). Prema tomu, primjenom neispravljenih vrijednosti mjerenja ukupne aktivnosti organskog ^{14}C dobiva se konzervativna procjena konstante brzine razgradnje. Postupci za procjenu koncentracija ispitivane tvari iz izmjerene radiokemijske aktivnosti na temelju različitih pojednostavljujućih pretpostavki opisani su u literaturi pod 2., 9., 10. i 11. Ti se postupci najlakše primjenjuju kod brzo razgradivih tvari.

2.2. TUMAČENJE REZULTATA

Ako se utvrdi da je k neovisan o povećanju koncentracije (tj. ako je izračunani k približno jednak pri različitim koncentracijama ispitivane tvari), može se poći od pretpostavke da je konstanta brzine prvog reda reprezentativna za primijenjene ispitne uvjete tj. za ispitivanu tvar, vodeni uzorak i ispitnu temperaturu. U kojoj se mjeri rezultati mogu uopćiti odnosno ekstrapolirati na druge sustave treba ocijeniti stručnom prosudbom. Ako se koristi visoka koncentracija ispitivane tvari i razgradnja stoga ne slijedi kinetiku prvog reda, podaci se neće moći koristiti za izravnu procjenu konstante brzine prvog reda odnosno odgovarajućeg vremena poluraspada. Ipak, podaci dobiveni u ispitivanju s visokom koncentracijom ispitivane tvari mogu se iskoristiti za procjenu stupnja ukupne mineralizacije i/ili utvrđivanje i kvantifikaciju proizvoda pretvorbe.

▼M1

Ako su poznati gubici u procesima različitim od biorazgradnje (npr. hidroliza ili isparavanje), oni se mogu oduzeti od neto gubitaka utvrđenih tijekom ispitivanja kako bi se dobila približna procjena biorazgradnje. Podaci o hidrolizi mogu se dobiti npr. pomoću sterilne kontrole ili iz paralelnog ispitivanja s višom koncentracijom ispitivane tvari.

Neizravno i izravno određivanje $^{14}CO_2$ (odjeljak 1.8.9.4. i Dodatak 3.) može se koristiti samo za mjerenje stupnja mineralizacije ispitivane tvari u CO_2. Radiokromatografija (RAD-TLC) i HPLC mogu se koristiti za analizu koncentracija ^{14}C obilježene ispitivane tvari i tvorbe značajnih proizvoda pretvorbe (odjeljak 1.8.9.4. stavak 3.). Izravna procjena vremena poluraspada moguća je samo ako nisu prisutni značajni proizvodi pretvorbe (definirani kao ≥ 10 % primijenjene količine ispitivane tvari). Ako su prisutni značajni proizvodi pretvorbe u smislu ove definicije, potrebno je detaljno vrednovanje podataka. To može uključivati ponovljeno ispitivanje i/ili utvrđivanje proizvoda pretvorbe (vidi odjeljak 1.8.9.5. prvi stavak), osim ako se sudbina proizvoda pretvorbe može prilično dobro odrediti na temelju iskustva (npr. informacije o putu razgradnje). Budući da udio ugljika ispitivane tvari koji prelazi u CO_2 nije uvijek jednak (što u velikoj mjeri ovisi o koncentraiji ispitivane tvari i drugih raspoloživih supstrata, ispitnim uvjetima i mikrobnoj zajednici), ovaj test ne omogućuje izravnu procjenu potpune biorazgradnje kao što je to slučaj kod testa opadanja DOC-a, ali rezultat je sličan onomu koji se dobije respirometrijskim testom. Stupanj mineralizacije će, prema tomu biti manji ili jednak minimalnom stupnju potpune biorazgradnje. Da bi se dobila cjelovitija slika potpune biorazgradnje (mineralizacija i ugradnja u biomasu), na kraju ispitivanja treba provesti analizu fazne razdiobe ^{14}C (vidi Dodatak 1.). Čestični ^{14}C sastojat će se od ^{14}C ugrađenog u bakterijsku biomasu i ^{14}C sorbiranog na organske čestice.

2.3. VALJANOST ISPITIVANJA

Ako se referentna tvar ne razgradi u očekivanom vremenskom razdoblju (za anilin i natrijev benzoat u pravilu manje od dva tjedna), treba posumnjati u valjanost ispitivanja i ispitivanje podvrgnuti dodatnim provjerama, ili ga ponoviti s novim vodenim uzorkom. U ISO prstenastom testu ove metode u kojemu je sudjelovalo sedam laboratorija iz raznih dijelova Europe, prilagođene konstante brzine razgradnje za anilin kretale su se između 0,3 i 1,7 dan^{-1}, prosječno 0,8 dan^{-1}, pri temperaturi od 20 °C uz standardnu grešku od ± 0,4 d^{-1} ($t_{1/2}$ = 0,9 dana). Uobičajena vremena prilagodbe bila su između 1 i 7 dana. Kod ispitanih voda zabilježena je bakterijska biomasa od 10^3 do 10^4 jedinica koje tvore kolonije (Colony Forming Units, CFU) po ml. Brzine razgradnje u srednjoeuropskim vodama koje su bogate nutrijentima bile su više nego u nordijskim oligotrofnim vodama, što može biti posljedica razlike u trofičkom stanju ili ranijeg izlaganja kemikalijama.

Kod radioaktivno obilježenih tvari ukupno iskorištenje (bilanca mase) na kraju pokusa trebalo bi iznositi između 90 % i 110 %, dok bi kod neobilježenih tvari početno iskorištenje na početku pokusa trebalo biti između 70 % i 110 %. Ipak, navedena područja treba shvatiti kao ciljne vrijednosti i ne treba ih koristiti kao kriterij za prihvaćanje ispitivanja.

▼M1

3. **IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU**

U izvješću o ispitivanju treba biti jasno navedena vrsta ispitivanja koje se provodi – pelagički test ili test sa suspendiranim sedimentom; osim toga, izvješće o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće informacije:

Ispitivana tvar i referentna(-e) tvar(i):

— uobičajeni nazivi, kemijski nazivi (po mogućnosti naziv IUPAC i/ili CAS), CAS brojevi, strukturne formule (uz naznaku položaja ^{14}C, ako se koristi radioaktivno obilježena tvar) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva ispitivane i referentne tvari (vidi odjeljke 1.5. i 1.6.),

— kemijski nazivi, CAS brojevi, strukturne formule (uz naznaku položaja ^{14}C, ako se koristi radioaktivno obilježena tvar) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva tvari koje se koriste kao standardi za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda pretvorbe,

— čistoća (nečistoće) ispitivanih i referentnih tvari,

— radiokemijska čistoća obilježene kemikalije i specifična aktivnost (prema potrebi).

Površinska voda:

Za vodeni uzorak treba navesti barem sljedeće podatke:

— lokacija i opis mjesta uzorkovanja uključujući, po mogućnosti, povijest onečišćenja,

— datum i vrijeme uzimanja uzorka,

— nutrijenti (ukupni N, amonij, nitrit, nitrat, ukupni P, otopljeni ortofosfat),

— dubina uzorkovanja,

— izgled uzorka (npr. boja, mutnoća),

— DOC i TOC,

— BPK,

— temperatura i pH na mjestu uzorkovanja u vrijeme uzorkovanja,

— kisik ili redoks potencijal (obvezno samo ako aerobni uvjeti nisu očiti),

— salinitet ili provodljivost (u slučaju morske i bočate vode),

— suspendirana kruta tvar (u slučaju mutnog uzorka),

— po mogućnosti i druge relevantne informacije o mjestu uzorkovanja u trenutku uzorkovanja (npr. aktualni ili povijesni podaci o brzini protoka rijeka ili morskih struja, značajnija ispuštanja otpadnih voda u blizini i vrsta otpadnih voda, vremenski uvjeti prije uzorkovanja),

i fakultativno:

— mikrobna biomasa (npr. izravno brojenje tehnikom bojenja akridinskom bojama ili jedinice koje tvore kolonije),

▼M1

— anorganski ugljik,

— koncentracija klorofila kao specifična procjena biomase algi.

Ako se provodi test sa suspendiranim sedimentom, treba navesti i sljedeće podatke o sedimentu:

— dubina uzorkovanja sedimenta,

— izgled sedimenta (npr. obojen, muljevit, praškast, pjeskovit),

— tekstura (npr. % krupnog pijeska, finog pijeska, praha i ilovače),

— suha masa u g/l suspendirane krute tvari, koncentracija TOC-a ili gubitak mase nakon zapaljenja kao mjera sadržaja organske tvari,

— pH,

— kisik ili redoks potencijal (obvezno samo ako aerobni uvjeti nisu očiti).

Ispitni uvjeti:

— vremenski razmak između uzorkovanja i uporabe u laboratorijskom ispitivanju, skladištenje uzorka i prethodna obrada uzorka, datumi provedbe istraživanja,

— primijenjena količina ispitivane tvari, ispitna koncentracija i referentna tvar,

— način primjene ispitivane tvari, uključujući uporabu otapala (prema potrebi),

— volumen upotrijebljene površinske vode i sedimenta (ako se koristi) i volumen uzorka koji se uzima na analizu u svakom vremenu uzorkovanja,

— opis ispitnog sustava koji se koristi.

Ako se ispitivanje ne može provesti u mraku, informacije o uvjetima „difuzne rasvjete”:

— informacije o metodi(-ama) koje su upotrijebljene za pripremu sterilnih kontrola (npr. temperatura, vrijeme i broj obrada u autoklavu),

— temperatura inkubacije,

— informacije o analitičkim tehnikama i metodi(-ama) koje se koriste za radiokemijska mjerenja i provjeru bilance mase te mjerenja fazne razdiobe (ako se provode),

— broj ponavljanja.

Rezultati:

— postotak iskorištenja (vidi odjeljak 1.7.1.),

— ponovljivost i osjetljivost primijenjenih analitičkih metoda, uključujući granicu detekcije (LOD) i granicu kvantifikacije (LOQ) (vidi odjeljak 1.7.2.),

▼M1

— prikaz svih izmjerenih podataka (uključujući vremena uzorkovanja) i izračunanih vrijednosti u tabličnom obliku i krivulje razgradnje; za svaku ispitnu koncentraciju i svako ponavljanje treba navesti koeficijent linearne korelacije za nagib logaritamskoga grafa, procijenjenu fazu prilagodbe i konstantu brzine prvog reda ili pseudoprvog reda (po mogućnosti) te odgovarajuće vrijeme polurazgradnje (odnosno vrijeme poluraspada t_{50}),

— prosjeci rezultata pojedinačnih ponavljanja za odgovarajuće vrijednosti, npr. dužina faze prilagodbe, konstanta brzine razgradnje i vrijeme polurazgradnje (ili t_{50}),

— kategorizirati sustav kao neprilagođeni sustav ili prilagođeni sustav s obzirom na izgled krivulje razgradnje i mogući utjecaj ispitne koncentracije,

— rezultati završne provjere bilance mase i rezultati mjerenja fazne razdiobe (prema potrebi),

— udio mineraliziranog ^{14}C i, ako se koriste specifične analize, konačna razina primarne razgradnje,

— utvrđivanje, molarna koncentracija i postotak primijenjene koncentracije i značajnih proizvoda pretvorbe (prema potrebi) (vidi odjeljak 1.8.9.5. prvi stavak),

— predloženi put pretvorbe, prema potrebi,

— rasprava rezultata.

4. **LITERATURA**

1. OECD TG 309 (2004.) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999.) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Ispitna metoda C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Ispitna metoda C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993.). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999.). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995.). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD (2000.). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984.). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000.). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999.). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Dodatak 1.

Fazna razdioba ^{14}C

U svrhu provjere postupka, rutinska mjerenja aktivnosti preostalog ukupnog organskog ^{14}C (TOA) treba nadopuniti mjerenjima bilance mase s izravnim određivanjem nastalog $^{14}CO_2$ koji se skuplja u apsorberu (vidi Dodatak 3.). Potvrda tvorbe $^{14}CO_2$ sama je po sebi izravan dokaz biorazgradnje, za razliku od abiotičke razgradnje i drugih mehanizama gubitaka, kao što je isparavanje ili sorpcija. Dodatne informacije koje mogu biti korisne za opisivanje procesa biorazgradnje mogu se dobiti mjerenjem razdiobe TOA između otopljenog stanja (aktivnost otopljenog organskog ^{14}C, DOA) i čestičnog stanja (aktivnost čestičnog organskog ^{14}C, POA) nakon odvajanja čestica membranskom filtracijom ili centrifugiranjem. POA se sastoji od ispitivane tvari sorbirane na mikrobnu biomasu i druge čestice te od ugljika sadržanog u ispitivanoj tvari koji se koristi za sintezu novog staničnog materijala i tako ugrađuje u čestičnu frakciju biomase. Tvorba otopljenog organskog ^{14}C materijala može se procijeniti kao DOA na kraju biorazgradnje (plato krivulje razgradnje u ovisnosti o vremenu).

Faznu razdiobu preostalog ^{14}C u odabranim uzorcima treba procijeniti filtriranjem uzoraka na membranskom filtru 0,22 μm ili 0,45 μm izrađenom od materijala koji ne adsorbira značajne količine ispitivane tvari (npr. polikarbonatni filteri). Ako dolazi do znatne sorpcije ispitivane tvari na filter koja se ne može zanemariti (ovo treba provjeriti prije pokusa), umjesto filtriranja se može koristiti centrifugiranje pri velikoj brzini (2 000 g; 10 min).

S filtratom odnosno centrifugatom se postupa kao s nefiltriranim uzorcima iz Dodatka 3. Membranski se filteri otope u prikladnoj scintilacijskoj tekućini i broji na uobičajeni način, u pravilu uz ispravak gašenja („quenching”) primjenom vanjskog standarda („external standard ratio method”), ili se upotrijebi oksidacijsko sredstvo za uzorak. Ako se koristi centrifugiranje, nastalu peletu čestične frakcije treba resuspendirati u 1 – 2 ml destilirane vode i prenijeti u scintilacijsku bočicu. Zatim se posuda dvaput ispere s 1 ml destilirane vode i voda od pranja prenese u bočicu. Suspenzija se prije brojenja metodom tekućinske scintilacije može prema potrebi obložiti gelom.

▼M1

Dodatak 2.

Polukontinuirani postupak

U slučaju postojanih tvari ponekad je potrebno produžiti vrijeme inkubacije i do nekoliko mjeseci da bi se postigla dostatna razgradnja. Ispitivanje u pravilu ne bi smjelo trajati duže od 60 dana, osim ako se ispitna suspenzija obnavlja kako bi se održala izvorna svojstva vodenog uzorka. Ipak, trajanje ispitivanja se može produžiti do najviše 90 dana i bez obnavljanja ispitne suspenzije ako je razgradnja ispitivane tvari započela unutar prvih 60 dana.

Kod dugotrajnije inkubacije raznolikost mikrobne zajednice može se smanjiti zbog različitih mehanizama gubitaka i mogućeg iscrpljenja zaliha esencijalnih nutrijenata i primarnih ugljičnih supstrata u vodenom uzorku. Stoga se kod tvari koje se sporo razgrađuju preporučuje primjena polukontinuiranog postupka kako bi se mogla pravilno odrediti brzina razgradnje. Ispitivanje treba započeti u polukontinuiranom postupku ako se na temelju ranijih iskustava očekuje da će za 20 %-tnu razgradnju tvari biti potrebno razdoblje inkubacije od tri mjeseca. Druga je mogućnost da se uobičajeni šaržni test pretvori u polukontinuirani ako tijekom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane tvari. Polukontinuirani postupak se može prekinuti i ispitivanje nastaviti šaržnim postupkom kad se zabilježi značajna razgradnja (npr. > 20 %).

U polukontinuiranom postupku se svaka dva tjedna otprilike jedna trećina volumena ispitne suspenzije zamjenjuje svježe prikupljenom vodom u koju je dodana ispitivana tvar u početnoj koncentraciji. Ako se koristi fakultativni test sa suspendiranim sedimentom, zamjenskoj vodi treba dodati i sediment u početnoj koncentraciji (između 0,01 i 1 g/l). Važno je naglasiti da se u slučaju provedbe testa sa suspendiranim česticama sedimenta sustav mora održavati u potpunoj suspenziji i tijekom obnavljanja vode te da vrijeme zadržavanja mora biti jednako za krute tvari i vodu, jer se u protivnome gubi predviđena sličnost s homogenim vodenim sustavom bez čvrstih faza. Stoga je kod primjene polukontinuiranog postupka poželjno da se početna koncentracija suspendiranog sedimenta odabere iz donjeg segmenta utvrđenog područja.

Ispitivana se tvar mora dodavati tako da kod djelomičnog obnavljanja ispitne suspenzije ne dođe do prekoračenja početne koncentracije ispitivane tvari kako bi se izbjegla prilagodba koja se često javlja pri visokim koncentracijama ispitivane tvari. Budući da postupak uključuje i ponovnu inokulaciju i nadoknađivanje potrošenih nutrijenata i primarnih supstrata, izvorna mikrobna raznolikost se ponovno uspostavlja i ispitivanje se teoretski može nastavljati beskonačno. Kod polukontinuiranog postupka važno je napomenuti da se preostala koncentracija ispitivane tvari mora ispraviti s obzirom na količine ispitivane tvari koje se dodaju i uklanjaju u svakom postupku obnavljanja. Ukupna koncentracija ispitivane tvari i koncentracija otopljene ispitivane tvari mogu se naizmjenično koristiti u slučaju spojeva kod kojih se ne dolazi do znatnije sorpcije. Sorpcija je u utvrđenim uvjetima (0,1 – 1 g krute tvari/l) beznačajna (< 5 %) kod tvari s log Kow < 3 (vrijedi za neutralne, lipofilne spojeve). To se može vidjeti i na računskom primjeru u nastavku. 0,1 g/l krute tvari otprilike odgovara 10 mg ugljika po litri (udio ugljika f_C = 0,01). Pretpostavimo da je:

Log K_{ow} (ispitivane tvari) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

podjelni koeficijent $K_d = f_C \times K_{oc}$

tada je otopljena frakcija ukupne koncentracije (C-voda (C_w)/C-ukupni (C_t)):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatak 3.

Određivanje $^{14}CO_2$

Neizravno određivanje $^{14}CO_2$

Neizravna metoda kod rutinskih mjerenja u pravilu zahtijeva manje vremena, a usto je i najpreciznija u slučaju tvari koje nisu hlapljive i ne prelaze u hlapljive proizvode. Nefiltrirani uzorci od npr. 5 ml jednostavno se prenesu u scintilacijske bočice. Prikladna početna aktivnost u uzorcima je 5 000 dpm – 10 000 dpm (80 – 170 Bq), a minimalna početna aktivnost iznosi oko 1 000 dpm. CO_2 se stripira nakon zakiseljavanja na pH 2 – 3 s 1 – 2 kapi koncentrirane H_3PO_4 ili HCl. Stripiranje CO_2 može se provesti upuhivanjem mjehurića zraka oko ½ do 1 sata. Kao druga mogućnost, bočice se snažno protresaju 1 – 2 sata (npr. na tresilici s mikropločama) ili se uz lakše protresanje ostave na tresilici preko noći. Učinkovitost postupka odvajanja CO_2 treba provjeriti (produženjem vremena dozračivanja ili tresenja). Zatim se doda scintilacijska tekućina prikladna za brojenje vodenih uzoraka, uzorak se homogenizira na vrtložnoj mješalici i odredi radioaktivnost brojenjem metodom tekućinske scintilacije te oduzme osnovna aktivnost utvrđena u slijepim probama (F_B). Ako ispitna voda nije jako obojena i ne sadrži visoku koncentraciju čestica, uzorci će u pravilu pokazivati ujednačeno gašenje („quenching”) i bit će dovoljno provesti ispravke za gašenje primjenom vanjskog standarda. Ako je ispitna voda jako obojena, ispravak za gašenje se ponekad mora provesti dodavanjem unutarnjeg standarda. U slučaju visoke koncentracije čestica nije uvijek moguće dobiti homogenu otopinu odnosno gel, ili se mogu javiti velike razlike u gašenju među uzorcima. U tom se slučaju na ispitni mulj može primijeniti metoda brojenja opisana u nastavku. Ako se koristi test sa suspendiranim sedimentom, mjerenje $^{14}CO_2$ može se provesti neizravno tako da se uzme homogeni uzorak ispitne vode/suspenzije od 10 ml i faze odvoje centrifugiranjem na prikladnoj brzini (npr. 15 minuta na 40 000 m/s^2). Zatim se s vodenom fazom postupa kako je gore opisano. Aktivnost ^{14}C u čestičnoj fazi (POA) određuje se tako da se sediment resuspendira u malom volumenu destilirane vode, prenese u scintilacijske bočice i zatim doda scintilacijska tekućina da bi se dobio gel (za ovo su predviđene posebne scintilacijske tekućine). Ovisno o vrsti čestica (npr. sadržaj organskog materijala), uzorak se eventualno može ostaviti preko noći da se otopi u sredstvu za otapanje tkiva, zatim homogenizirati na vrtložnoj mješalici i onda dodati scintilacijsku tekućinu. Druga je mogućnost da se POA odredi sagorijevanjem viška kisika pomoću oksidacijskog sredstva. Kod brojenja treba uvijek uključiti unutarnje standarde, a ispravke za gašenje ponekad je potrebno napraviti dodavanjem unutarnjeg standarda u svaki pojedini uzorak.

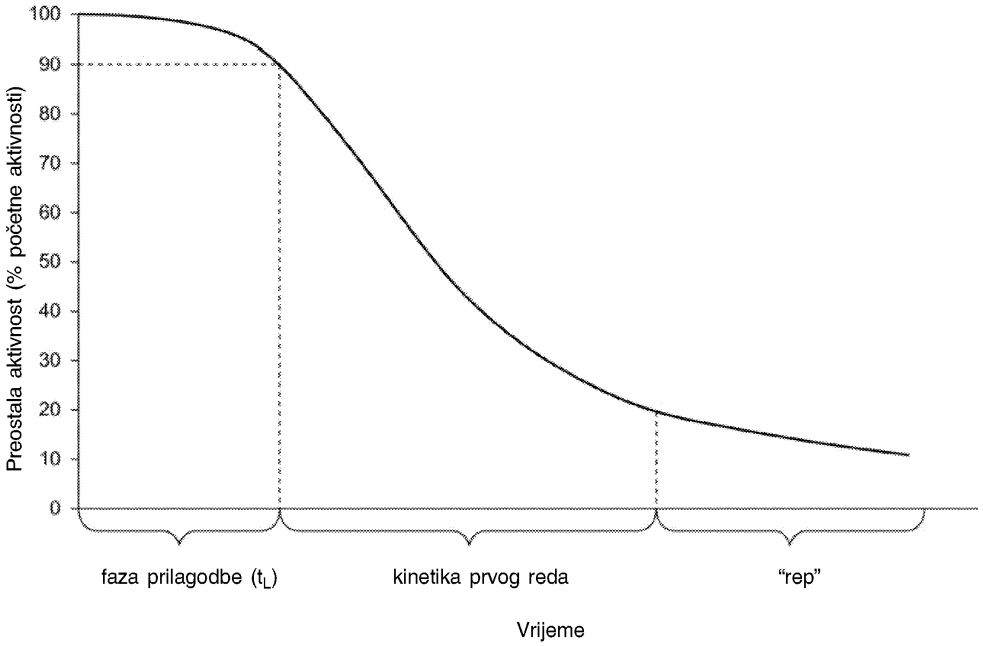
Izravno određivanje $^{14}CO_2$

Ako se nastali $^{14}CO_2$ mjeri izravno, na početku ispitivanja treba pripremiti više ispitnih tikvica i u svakoj mjernoj točki uzimati čitave tikvice, zakiseliti na pH 2 – 3 i skupljati $^{14}CO_2$ u unutarnjem apsorberu (koji se stavlja u svaku ispitnu tikvicu na početku ispitivanja) ili vanjskom apsorberu. Kao apsorpcijsko sredstvo može se koristiti alkalijska tvar (npr. otopina 1 N NaOH ili peleta NaOH), etanolamin ili apsorberi na bazi etanolamina koji su dostupni na tržištu. Kod izravnog mjerenja $^{14}CO_2$ tikvice moraju biti zatvorene npr. zatvaračima od butilne gume.

▼**M1**

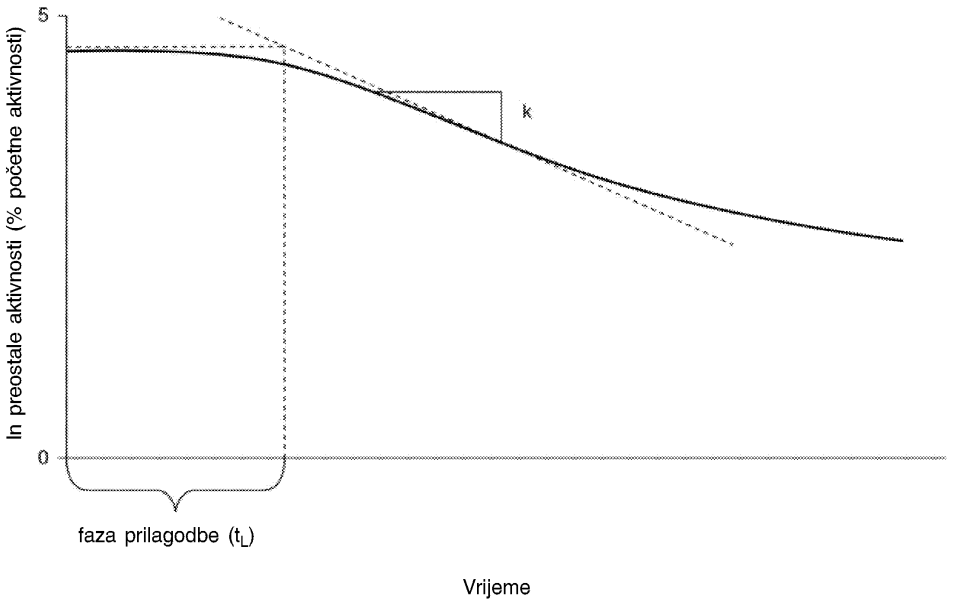
Slika 1.a

Primjer aritmetičkog prikaza podataka (preostala aktivnost u ovisnosti o vremenu)



Slika 1.b

Primjer polulogaritamskog prikaza podataka (ln preostale aktivnosti u ovisnosti o vremenu)



▼M6

C.26. TEST INHIBICIJE RASTA VRSTA *LEMNA*

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 221 (2006.). Ova je ispitna metoda namijenjena ocjenjivanju toksičnosti kemikalija za slatkovodne biljke roda *Lemna* (vodena leća). Temelji se na postojećim metodama (1) (2) (3) (4) (5) (6), ali uključuje neke izmjene tih metoda u svjetlu posljednjih istraživanja i savjetovanja o nizu ključnih pitanja. Ova je ispitna metoda validirana međunarodnim prstenastim testom (7).

2. U ovoj su ispitnoj metodi opisana toksikološka ispitivanja s vrstama *Lemna gibba* i *Lemna minor* koje su do sada već znatno proučavane i predmet su navedenih normi. Taksonomija *Lemna* spp. složena je zbog velikog broja različitih fenotipa. Iako se u odgovoru na toksično djelovanje kod vrsta *Lemna* može javiti određena genetska varijabilnost, trenutačno nema dovoljno podataka o tom izvoru varijabilnosti da bi se mogao preporučiti neki određeni klon za ovu ispitnu metodu. Valja napomenuti da se ispitivanje ne provodi aksenično, ali se u pojedinim fazama ispitnog postupka poduzimaju koraci kako bi se onečišćenje drugim organizmima svelo na najmanju moguću mjeru.

3. Opisani su detalji ispitivanja s obnavljanjem (polustatičko i protočno) i bez obnavljanja (statičko) ispitne otopine. Ovisno o ciljevima ispitivanja i regulatornim zahtjevima, preporučuje se da se ispita mogućnost primjene polustatičkih i protočnih metoda, npr. kod kemikalija koje se brzo gube iz otopine zbog isparavanja, fotokemijske razgradnje, taloženja ili biorazgradnje. Dodatne smjernice mogu se pronaći u literaturi (8).

4. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

5. Eksponencijalno rastuće biljne kulture roda *Lemna* puste se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama ispitivane kemikalije u razdoblju od sedam dana. Cilj je ispitivanja kvantificirati učinke kemikalije na vegetativni rast tijekom toga razdoblja ocjenjivanjem odabranih mjernih varijabli. Broj listova primarna je mjerna varijabla. Osim toga, mjeri se barem još jedna mjerna varijabla (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa), budući da neke kemikalije znatno više utječu na neke druge mjerne varijable nego na broj listova. Da bi se kvantificirali učinci kemikalije, rast u ispitnim otopinama uspoređuje se s rastom u kontrolama i određuje koncentracija koja izaziva određeni postotak (x %) inhibicije rasta (npr. 50 %), koja se izražava kao EC_x (npr. EC_{50}).

6. Krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta koja se izražava kao logaritamsko povećanje mjerne varijable (prosječna specifična brzina rasta) u razdoblju izlaganja. Iz prosječnih specifičnih brzina rasta zabilježenih u nizu ispitnih otopina određuje se koncentracija koja izaziva određeni postotak (x %) inhibicije brzine rasta (npr. 50 %) koja se izražava kao E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

7. U ovoj se ispitnoj metodi upotrebljava i prirast kao dodatna varijabla odgovora koja je potrebna da bi se ispunili određeni regulatorni zahtjevi u nekim državama. Definiran je kao razlika između mjernih varijabli na kraju razdoblja izlaganja i mjernih varijabli na početku razdoblja izlaganja. Iz prirasta zabilježenog u nizu ispitnih otopina izračunava se koncentracija koja izaziva određeni postotak (x %) inhibicije prirasta (npr. 50 %), koja se izražava kao E_yC_x (npr. E_yC_{50}).

▼M6

8. Osim toga, može se statistički odrediti najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

9. Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju kemikalije u ispitnom mediju.

10. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati informacije o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturna formula, čistoća, topljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, pK_a, K_{ow}, tlak pare i biorazgradivost. Topljivost u vodi i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti treba li u razdoblju ispitivanja očekivati značajne gubitke ispitivane kemikalije. Na taj se način prema potrebi mogu poduzeti određene mjere za nadzor tih gubitaka. Ako su informacije o topljivosti i stabilnosti ispitivane kemikalije nesigurne, preporučuje se da se topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije ocijene u uvjetima ispitivanja, tj. u uzgojnom mediju te pri temperaturi i režimu rasvjete koji će se upotrebljavati tijekom ispitivanja.

11. U slučajevima kad je nadziranje pH-vrijednosti ispitnog medija posebno važno, npr. kod ispitivanja metala ili kemikalija koje su hidrolitički nestabilne, preporučuje se dodavanje pufera u uzgojni medij (vidjeti stavak 21.). Dodatne smjernice za ispitivanje kemikalija čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u literaturi pod (8).

VALJANOST ISPITIVANJA

12. Da bi ispitivanje bilo valjano, vrijeme potrebno da se broj listova u kontrolnom uzorku udvostruči mora biti kraće od 2,5 dana (60 sati), što približno odgovara sedmerostrukom povećanju u sedam dana i prosječnoj specifičnoj brzini rasta od 0,275 d^{-1}. Uz medije i ispitne uvjete opisane u metodi taj se kriterij može zadovoljiti primjenom statičkog režima ispitivanja (5). Također se očekuje da će se taj kriterij moći ispuniti u polustatičkim i protočnim uvjetima ispitivanja. Izračunavanje vremena potrebnog za udvostručenje prikazano je u stavku 49.

REFERENTNA KEMIKALIJA

13. Jedna ili više referentnih kemikalija, kao što je 3,5-diklorfenol koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom ispitivanju (7), mogu se ispitati radi provjere postupka ispitivanja. Preporučljivo je da se referentna kemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s određivanjem toksičnosti ispitivane kemikalije.

OPIS METODE

Aparatura

14. Sva oprema koja dolazi u dodir s ispitnim medijima mora biti izrađena od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Staklena oprema koja se upotrebljava za uzgoj i ispitivanje mora biti sterilna i potrebno ju je očistiti od kemijskih onečišćivača koji bi mogli dospjeti u ispitni medij. Ispitne posude moraju biti dovoljno široke da listovi različitih kolonija u kontrolnim posudama mogu rasti tako da na kraju ispitivanja ne dođe do preklapanja među listovima. Ne smeta ako korijenje dodiruje dno ispitne posude, ali preporučuje se da sve posude imaju dubinu od najmanje 20 mm i volumen od najmanje 100 ml. Vrsta ispitnih posuda nije važna sve dok su ti zahtjevi ispunjeni. Prikladnima su se pokazale staklene čaše, zdjelice za kristalizaciju i staklene Petrijeve zdjelice odgovarajućih dimenzija. Ispitne

▼M6

posude treba prekriti kako bi se smanjilo isparavanje i slučajna onečišćenja, ali pritom treba omogućiti nužan protok zraka. Ispitne posude, a posebno poklopci, ne smiju stvarati sjenu niti izazivati promjene u spektralnim svojstvima svjetlosti.

15. Kulture i ispitne posude ne smiju se držati zajedno. To je najlakše postići ako se upotrijebe odvojene uzgojne komore, inkubatori ili prostorije. Osvjetljenje i temperaturu treba nadzirati i održavati na stalnoj razini (vidjeti stavke 35. i 36.).

Ispitni organizam

16. Organizmi koji se upotrebljavaju za ovo ispitivanje su *Lemna gibba* ili *Lemna minor*. Kratak opis vrsta vodenih leća koje se upotrebljavaju u toksikološkim ispitivanjima nalazi se u Dodatku 2. Biljni se materijal može nabaviti u zbirkama kultura, od drugog laboratorija ili se može prikupiti na terenu. Ako se materijal prikuplja na terenu, biljke treba držati u kulturi u mediju kakav će se upotrebljavati u ispitivanju najmanje osam tjedana prije uporabe. Mjesta na kojima se prikupljaju polazne kulture ne smiju biti onečišćena očitim izvorima onečišćenja. Ako se kulture nabavljaju od drugog laboratorija ili iz zbirke kultura, treba ih držati u sličnim uvjetima najmanje tri tjedna. Izvor biljnog materijala te vrstu i klon (ako je poznat) koji se upotrebljavaju kod ispitivanja treba svaki puta dokumentirati.

17. Primjenjuju se monokulture kod kojih nisu prisutna vidljiva onečišćenja drugim organizmima kao što su alge i praživotinje. Zdrave biljke *L. minor* sastoje se od kolonija koje sadržavaju između dva i pet listova, dok zdrave kolonije *L. gibba* mogu imati i do sedam listova.

18. Biljke treba pažljivo odabrati jer kakvoća i jednolikost biljaka koje se upotrebljavaju u ispitivanju imaju značajan utjecaj na rezultate ispitivanja. Treba upotrijebiti mlade brzorastuće biljke bez vidljivih oštećenja i promjena boje (kloroza). Osobina je kvalitetnih kultura visok udio kolonija koje sadržavaju najmanje dva lista. Velik broj kolonija s jednim listom ukazuje na okolišni stres, npr. ograničene nutrijente, pa se biljni materijal iz takvih kultura ne bi smio upotrebljavati za ispitivanja.

Uzgoj kulture

19. Da bi se smanjili zahtjevi održavanja (npr. kad određeno vrijeme nisu planirana ispitivanja s vodenom lećom), kulture se mogu držati pod smanjenim osvjetljenjem i na nižoj temperaturi (od 4 do 10 °C). Informacije o uzgoju nalaze se u Dodatku 3. U slučaju očitih znakova onečišćenja algama i drugim organizmima, poduzorak listova *Lemna* treba podvrgnuti površinskoj sterilizaciji i prenijeti ga u svježi medij (vidjeti Dodatak 3.). U tom slučaju ostatak onečišćene kulture treba baciti.

20. Najmanje sedam dana prije ispitivanja dovoljno kolonija treba aseptički prenijeti u svježi sterilni medij i uzgajati sedam do deset dana u uvjetima ispitivanja.

Ispitni medij

21. Za vrste *Lemna minor* i *Lemna gibba* preporučuju se različiti mediji, kako je opisano u nastavku. Treba dobro razmisliti prije nego što se u ispitni medij doda pH pufer (MOPS (4-morfolinpropan-sulfonska kiselina, CAS br. 1132-61-2) u medij za *L. minor* i $NaHCO_3$ u medij za *L. gibba*) ako se sumnja da bi pufer mogao reagirati s ispitivanom kemikalijom i utjecati na očitovanje njezinih toksičnih svojstava. Prihvatljiv je i medij Steinberg (9) pod uvjetom da su zadovoljeni kriteriji valjanosti.

▼M6

22. Za uzgoj kulture i ispitivanje s *L. minor* preporučuje se izmijenjena varijanta uzgojnog medija Lemna prema švedskoj normi (SIS). Sastav tog medija naveden je u Dodatku 4.

23. Uzgojni medij 20X – AAP, kako je opisan u Dodatku 4., preporučuje se za uzgoj kulture i ispitivanja s *L. gibba*.

24. Medij Steinberg koji je opisan u Dodatku 4. također je prikladan za *L. minor*, ali se može upotrijebiti i za *L. gibba* pod uvjetom da su zadovoljeni kriteriji valjanosti.

Ispitne otopine

25. Ispitne se otopine obično pripremaju razrjeđivanjem radne otopine. Radne otopine ispitivane kemikalije u pravilu se pripremaju otapanjem kemikalije u uzgojnom mediju.

26. Najviša ispitna koncentracija ispitivane kemikalije u pravilu ne smije biti viša od topljivosti kemikalije u vodi u ispitnim uvjetima. Ipak, valja napomenuti da *Lemna* spp. plutaju na površini i mogu biti izložene kemikalijama koje se skupljaju u sučelju voda-zrak (npr. tvari koje su slabo topljive u vodi, hidrofobne kemikalije ili površinski aktivne kemikalije). U tim su uvjetima organizmi izloženi materijalu koji se nalazi izvan otopine i ispitne koncentracije mogu, ovisno o svojstvima ispitivane kemikalije, biti više od topljivosti u vodi. Kod ispitivanih kemikalija niske topljivosti u vodi ponekad je potrebno pripremiti koncentriranu radnu otopinu ili disperziju kemikalije upotrebljavajući organsko otapalo ili dispergent kako bi se olakšalo dodavanje točnih količina ispitivane kemikalije u ispitni medij i ubrzalo njezino dispergiranje i otapanje. U svakom slučaju, treba nastojati izbjeći primjenu takvih materijala kad god je to moguće. Upotrijebljena pomoćna otapala odnosno dispergenti ne bi smjeli imati fitotoksično djelovanje. Primjeri su otapala u širokoj uporabi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju u svakom slučaju treba svesti na najmanju moguću mjeru (≤ 100 µl/l) i voditi računa o tome da sve obrade i kontrole sadrže istu koncentraciju otapala odnosno dispergenta.. Dodatne smjernice o uporabi dispergenata navedene su u literaturi pod (8).

Ispitne i kontrolne skupine

27. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane kemikalije za vodenu leću, npr. na temelju ispitivanja za određivanje raspona, mogu pomoći u odabiru prikladnih ispitnih koncentracija. Kod glavnog ispitivanja toksičnosti u pravilu je potrebno najmanje pet ispitnih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu. Ispitne se koncentracije po mogućnosti ne bi smjele razlikovati za faktor viši od 3,2, ali može se upotrijebiti i viša vrijednost ako je krivulja koncentracija-odgovor ravna. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Pri svakoj su koncentraciji potrebna najmanje tri ponavljanja.

28. Kod određivanja raspona ispitnih koncentracija (za ispitivanje za određivanje raspona i/ili glavno ispitivanje toksičnosti) treba uzeti u obzir sljedeće:

— da bi se kod određivanja EC_x osigurala potrebna razina pouzdanosti, vrijednost EC_x mora se nalaziti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Primjerice, ako se procjenjuje EC_{50}, najviša ispitna koncentracija mora biti viša od EC_{50}. Ako se vrijednost EC_{50} nalazi izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno ocijeniti statističku prikladnost modela.

— Ako je cilj procijeniti LOEC/NOEC, najniža ispitna koncentracija mora biti dovoljno niska da rast ne bude značajno niži od rasta u kontrolnoj skupini. Isto tako, najviša ispitna koncentracija mora biti dovoljno visoka da rast bude značajno niži nego u kontrolnoj skupini. Ako to nije slučaj,

▼M6

ispitivanje je potrebno ponoviti s drugim rasponom koncentracija (osim ako je najviša koncentracija na granici topljivosti ili jednaka maksimalnoj predviđenoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg/l).

29. Svako ispitivanje uključuje kontrole s istim hranjivim medijem, istim brojem listova i kolonija, okolnim uvjetima te postupcima kao kod ispitnih posuda, ali bez ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljava pomoćno otapalo ili dispergent, potrebna je dodatna kontrola koja sadržava istu koncentraciju otapala/dispergenta kao posude s ispitivanom kemikalijom. Broj ponavljanja kontrolnih posuda (i posuda s otapalom, ako se upotrebljava) mora biti barem jednak broju posuda upotrijebljenih za svaku ispitnu koncentraciju, a po mogućnosti i dvostruko veći.

30. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Ipak, broj kontrolnih ponavljanja mora biti najmanje tri.

Izlaganje

31. Kolonije koje se sastoje od dva do četiri vidljiva lista prenesu se iz kulture inokuluma i nasumce raspodijele po ispitnim posudama u aseptičnim uvjetima. Svaka ispitna posuda mora sadržavati ukupno devet do 12 listova. Broj listova i kolonija mora biti jednak u svim ispitnim posudama. Iskustva s ovom metodom i podaci iz međulaboratorijskog ispitivanja pokazuju da je dovoljno upotrijebiti tri ponavljanja po obradi, od kojih svako u početku sadržava devet do 12 listova, da se između obrada utvrde razlike u rastu na razini inhibicije od približno 4 do 7 %, izračunano na temelju brzine rasta (10 do 15 % izračunano na temelju prirasta) (7).

32. Ispitne posude treba nasumce rasporediti po inkubatoru kako bi se smanjio utjecaj prostornih razlika u svjetlosti i temperaturi. Osim toga, kod promatranja treba primijeniti blokni raspored ili slučajno razmještanje posuda (ili češće razmještanje).

33. Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti pokaže da se koncentracija ispitivane kemikalije ne može održati (tj. izmjerena koncentracija padne ispod 80 % izmjerene početne koncentracije) tijekom razdoblja ispitivanja (sedam dana), preporučuje se polustatički ispitni režim. U tom slučaju kolonije treba izložiti svježe pripremljenim ispitnim i kontrolnim otopinama najmanje dvaput tijekom ispitivanja (npr. trećeg i petog dana). Učestalost izlaganja svježem mediju ovisit će o stabilnosti ispitivane kemikalije; u slučaju vrlo nestabilnih i hlapljivih kemikalija potrebno je češće izlaganje da bi se održale približno stalne koncentracije. U određenim okolnostima može biti potrebna primjena protočnog postupka (8) (10).

34. Ova ispitna metoda ne uključuje scenarij izlaganja kod folijarne primjene (raspršivanje); umjesto toga, vidjeti (11).

Uvjeti inkubacije

35. Potrebna je neprekidna toplo ili hladno bijela fluorescentna rasvjeta čiji intenzitet treba odabrati unutar područja od 85 do 135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, mjereno u području fotosintetički aktivnog zračenja (400 – 700 nm) u točkama koje su na istoj udaljenosti od izvora svjetlosti kao i listovi *Lemna* (što odgovara 6 500 – 10 000 lx). Odstupanja od odabranog intenziteta svjetlosti u ispitnom prostoru ne smiju biti viša od ± 15 %. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utječu na izmjerenu

▼M6

vrijednost. Sferičnim senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim” senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer daju više mjerne vrijednosti kod višetočkastog izvora svjetlosti kakav je ovdje opisan.

36. Temperatura u ispitnim posudama mora biti 24 ± 2 °C. pH-vrijednost kontrolnog medija tijekom ispitivanja ne smije se povećati za više od 1,5 jedinica. Ipak, odstupanje za više od 1,5 jedinica ne dovodi u pitanje valjanost ispitivanja ako se može dokazati da su zadovoljeni kriteriji valjanosti. Pomak pH-vrijednosti ipak u nekim posebnim slučajevima zahtijeva povećanu pozornost, npr. kad se ispituju nestabilne kemikalije ili metali. Za dodatne smjernice vidjeti (8).

Trajanje

37. Ispitivanje se prekida sedam dana nakon što se biljke prenesu u ispitne posude.

Mjerenja i analitička određivanja

38. Na početku ispitivanja izbroje se listovi u ispitnim posudama i zabilježi se broj listova, pazeći da se uzmu u obzir svi istureni, jasno vidljivi listovi. Broj listova normalnog i promijenjenog izgleda određuje se na početku ispitivanja, najmanje jedanput svaka tri dana u razdoblju izlaganja (tj. najmanje dva puta u razdoblju od sedam dana) i po završetku ispitivanja. Treba zabilježiti sve promjene u razvoju biljaka, npr. promjene u veličini listova ili izgledu, naznake nekroze, kloroze ili nabrekline, raspadanje kolonija ili gubitak sposobnosti plivanja te promjene dužine i izgleda korijenja. Također treba zabilježiti značajna svojstva ispitnog medija (npr. prisutnost neotopljenog materijala, rast algi u ispitnoj posudi).

39. Osim određivanja broja listova tijekom ispitivanja, ocjenjuju se i učinci ispitivane kemikalije na jednu (ili više) sljedećih mjernih varijabli:

i. ukupnu lisnu površinu;

ii. suhu masu;

iii. svježu masu.

40. Ukupna lisna površina ima prednost u tome da se može odrediti za svaku ispitnu i kontrolnu posudu na početku, za vrijeme i na kraju ispitivanja. Suhu odnosno svježu masu treba odrediti na početku ispitivanja, i to na uzorku kulture inokuluma koja je reprezentativna za materijal upotrijebljen na početku ispitivanja, te na kraju ispitivanja na biljnom materijalu iz svake ispitne i kontrolne posude. Ako se ne mjeri lisna površina, suhoj se masi daje prednost u odnosu na svježu masu.

41. Ukupna lisna površina, suha masa i svježa masa mogu se odrediti na sljedeći način:

i. *Ukupna lisna površina:* Ukupna lisna površina svih kolonija može se odrediti slikovnom analizom. Obris ispitne posude i biljaka snimi se videokamerom (npr. posuda se položi na UV-lampu) i dobivena se slika digitalizira. Ukupna lisna površina u ispitnoj posudi može se zatim odrediti kalibracijom s plošnim oblicima poznate površine. Pritom treba voditi računa o tome da se isključi utjecaj ruba ispitne posude. Drugi je, nešto zamorniji postupak da se ispitne posude i biljke fotokopiraju te se dobiveni obris kolonija izreže i površina se odredi uz pomoć analizatora lisne površine ili milimetarskog papira. Mogu biti prikladne i druge tehnike (npr. omjer papirne mase između površine obrisa kolonija i jedinične površine).

▼M6

ii. *Suha masa:* Sve se kolonije izvade iz ispitnih posuda i isperu destiliranom ili deioniziranom vodom. Višak vode upije se papirom i kolonije suše na 60 °C dok se ne postigne stalna masa. Treba uključiti sve ostatke korijenja. Suhu masu treba izraziti s točnošću od najmanje 0,1 mg.

iii. *Svježa masa:* Sve se kolonije prenesu u prethodno izvagane polistirenske epruvete (ili epruvete od drugog inertnog materijala) koje u zaobljenom dnu imaju sitne rupice (1 mm). Epruvete se zatim deset minuta centrifugiraju na 3 000 o/min pri sobnoj temperaturi. Epruvete, koje sada sadržavaju osušene kolonije, ponovno se izvažu i izračuna se svježa masa oduzimanjem mase prazne epruvete.

Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

42. Ako se primjenjuje statički postupak, pH-vrijednost treba izmjeriti u svakoj obradi na početku i na kraju ispitivanja. U slučaju polustatičkog postupka pH treba izmjeriti u svakoj šarži „svježe" ispitne otopine prije svakog obnavljanja te u odgovarajućim „potrošenim" otopinama.

43. Intenzitet svjetlosti treba izmjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji u točkama koje su na istoj udaljenosti od izvora svjetlosti kao i listovi vodene leće. Mjerenja se provode najmanje jedanput tijekom ispitivanja. Najmanje jedanput dnevno treba bilježiti temperaturu medija u jednoj zamjenskoj („surogat") posudi koja se drži u istim uvjetima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

44. Koncentracije ispitivane kemikalije određuju se u prikladnim razmacima tijekom ispitivanja. Kod statičkog se ispitivanja koncentracije moraju odrediti barem na početku i na kraju ispitivanja.

45. U slučaju polustatičkih ispitivanja kod kojih se ne očekuje da će koncentracija ispitivane kemikalije ostati u granicama ± 20 % nazivne koncentracije potrebno je analizirati sve svježe pripremljene ispitne otopine i zatim ponoviti analizu kod svakog obnavljanja (vidjeti stavak 33.). Ipak, kod ispitivanja u kojima izmjerena početna koncentracija ispitivane kemikalije nije u granicama ± 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar područja od 80 do 120 % početne koncentracije), kemijska se određivanja mogu provoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje koncentracija ispitivane kemikalije prije obnavljanja treba provesti samo na jednoj posudi u svakoj ispitnoj koncentraciji (ili na združenom sadržaju posuda ponavljanja).

46. Ako se primjenjuje protočni postupak, može se primijeniti sličan režim uzorkovanja poput onoga koji je opisan za polustatička ispitivanja, uključujući analizu na početku, u sredini i na kraju ispitivanja, ali u tom slučaju nije primjereno mjerenje „potrošenih" otopina. Kod ovakvih ispitivanja treba svakodnevno provjeravati brzinu protoka vode za razrjeđivanje i ispitivane kemikalije odnosno radne otopine ispitivane kemikalije.

47. Ako postoje dokazi da se koncentracija ispitivane kemikalije tijekom ukupnog trajanja ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako je odstupanje od nazivne ili izmjerene početne koncentracije veće od ± 20 %, analiza rezultata mora se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili modelima koji opisuju opadanje koncentracije ispitivane kemikalije (8).

▼M6

Granično ispitivanje

48. U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana kemikalija nema toksično djelovanje u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice topljivosti u ispitnom mediju (ovisno o tomu što je manje), može se provesti granično ispitivanje za usporedbu odgovora kontrolne skupine s jednom ispitnom skupinom (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici topljivosti). Preporučuje se da se uz granično ispitivanje svakako napravi analiza koncentracije izloženosti. Za granično ispitivanje vrijede svi navedeni ispitni uvjeti i kriteriji valjanosti, s time da je potrebno udvostručiti broj ponavljanja u ispitnoj skupini. Rast u kontrolnoj i ispitnoj skupini može se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Vrijeme udvostručenja

49. Da bi se odredilo vrijeme koje je potrebno da se broj listova udvostruči *(T_d)* i utvrdilo ispunjuje li istraživanje ovaj kriterij valjanosti (stavak 12.), dobivene podatke za kontrolne posude treba uvrstiti u sljedeću formulu:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

gdje je μ prosječna specifična brzina rasta određena onako kako je opisano u stavcima 54. i 55.

Varijable odgovora

50. Svrha je ispitivanja odrediti učinke ispitivane kemikalije na vegetativni rast vrsta roda *Lemna*. U ovoj su ispitnoj metodi opisane dvije varijable odgovora, budući da različite jurisdikcije imaju različite preferencije i regulatorne zahtjeve. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim jurisdikcijama, učinke treba ocijeniti primjenom obiju varijabli odgovora opisanih u nastavku pod točkama (a) i (b).

(a) Prosječna specifična brzina rasta: ova se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena logaritama broja listova i osim toga na temelju promjena logaritama nekog drugog mjernog parametra (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa) u vremenu (izraženo po danu) u kontrolama i svim ispitnim skupinama. Ponekad se naziva i relativnom brzinom rasta (12).

(b) Prirast: ova se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena broja listova i osim toga na temelju promjena nekog drugog mjernog parametra (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa) u kontrolama i svim ispitnim skupinama do kraja ispitivanja.

51. Valja napomenuti da vrijednosti toksičnosti izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir kod primjene rezultata ispitivanja. Ako su ispoštovani ispitni uvjeti ove metode, vrijednosti EC_x na temelju prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) općenito su više od rezultata na temelju prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. To ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti dviju varijabli odgovora, nego naprosto prihvatiti da su te vrijednosti matematički različite. Pojam prosječne specifične brzine rasta temelji se na općenitom obrascu eksponencijalnog rasta vodene leće u neograničenim kulturama, gdje se toksičnost procjenjuje na temelju učinaka na brzinu rasta neovisno o apsolutnoj vrijednosti specifične brzine rasta u kontrolnoj skupini, nagibu krivulje koncentracija-odgovor ili trajanju ispitivanja. Za

▼M6

razliku od toga, rezultati koji se temelje na varijabli odgovora „prirast" ovise o svim tim drugim varijablama. E_yC_x ovisi o specifičnoj brzini rasta vrsta vodene leće koje se upotrebljavaju u ispitivanju i o maksimalnoj specifičnoj brzini rasta, koja se može razlikovati među vrstama, pa čak i različitim klonovima. Ovu varijablu odgovora ne treba upotrebljavati za usporedbu osjetljivosti na toksine među vrstama vodene leće, pa čak ni među klonovima. Iako se, sa znanstvenog stajališta, procjeni toksičnosti na temelju prosječne specifične brzine rasta daje prednost, u ovu su ispitnu metodu uključene i procjene na temelju prirasta kako bi se zadovoljili trenutačni regulatorni zahtjevi u nekim jurisdikcijama.

52. Procjene toksičnosti treba temeljiti na broju listova i jednoj dodatnoj mjernoj varijabli (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa), jer neke kemikalije mogu znatno više utjecati na neke druge mjerne varijable nego na broj listova. Taj bi utjecaj ostao neotkriven kad bi se samo računao broj listova.

53. Broj listova, kao i sve druge dokumentirane mjerne varijable, tj. ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa, treba uvrstiti u tablicu zajedno s koncentracijama ispitivane kemikalije pri svakom mjerenju. Kasnija analiza podataka, npr. za procjenu vrijednosti LOEC, NOEC ili EC_x, mora se temeljiti na vrijednostima pojedinačnih ponavljanja, a ne na izračunanim srednjim vrijednostima po ispitnim skupinama.

Prosječna specifična brzina rasta

54. Prosječna specifična brzina rasta za određeno razdoblje izračunava se kao logaritamsko povećanje varijabli rasta – broj listova i još jedna mjerna varijabla (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa) – primjenom formule u nastavku za svako ponavljanje u kontrolama i obradama:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdje je:

— μ_{i-j}: prosječna specifična brzina rasta od vremena i do j,

— N_i: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i,

— N_j: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j,

— t: vremensko razdoblje od i do j.

Za svaku ispitnu i kontrolnu skupinu treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta s procjenom varijance.

55. Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo razdoblje ispitivanja (vrijeme „i" u gornjoj formuli početak je ispitivanja, a vrijeme „j" je kraj ispitivanja). Izračuna se srednja vrijednost prosječne specifične brzine rasta s procjenom varijance za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu. Osim toga, odredi se etapna brzina rasta kako bi se ocijenili učinci ispitivane kemikalije koji se javljaju tijekom razdoblja izlaganja (npr. pregledom logaritamski transformiranih krivulja rasta). Značajne razlike između etapne brzine rasta i prosječne brzine rasta ukazuju na odstupanje od stalnog eksponencijalnog rasta i u tom slučaju treba temeljito preispitati krivulju rasta. Konzervativniji pristup u ovakvim bi slučajevima bio usporediti specifične brzine rasta obrađenih kultura u razdoblju maksimalne inhibicije sa specifičnim brzinama rasta kontrolnih kultura tijekom istog razdoblja.

56. Postotak inhibicije brzine rasta (I_r) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (ispitnu skupinu) prema sljedećoj formuli:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

gdje je:

— % I_r: postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta,

— μ_C: srednja vrijednost μ u kontroli,

— μ_T: srednja vrijednost μ u ispitnoj skupini.

Prirast

57. Učinci na prirast određuju se na temelju dviju mjernih varijabli, broja listova i još jedne mjerne varijable (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa) u svakoj ispitnoj posudi na početku i na kraju ispitivanja. Početna biomasa za suhu i svježu masu određuje se na temelju uzorka listova uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda (vidjeti stavak 20.). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prirasta s procjenama varijance. Srednji postotak inhibicije prirasta (% I_y) za svaku ispitnu skupinu može se izračunati na sljedeći način:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

gdje je:

— % I_y: postotak smanjenja prirasta,

— b_C: konačna biomasa umanjena za početnu biomasu kontrolne skupine,

— b_T: konačna biomasa umanjena za početnu biomasu ispitne skupine.

Prikaz krivulja koncentracija-odgovor

58. Treba prikazati krivulje koncentracija-odgovor iz kojih je vidljiv odnos srednjeg postotka inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y izračunanih kako je navedeno u stavcima 56. ili 57.) i logaritamske koncentracije ispitivane kemikalije.

Procjena vrijednosti EC_x

59. EC_x (npr. EC_{50}) treba procijeniti i na temelju prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) i na temelju prirasta (E_yC_x), pri čemu se svaka od tih vrijednosti mora temeljiti na broju listova i još jednoj mjernoj varijabli (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa). To je stoga što neke ispitivane kemikalije ne utječu jednako na broj listova i na druge mjerne varijable. Traženi parametri toksičnosti stoga su četiri vrijednosti EC_x za svaku izračunanu razinu inhibicije x: E_rC_x (broj listova); E_rC_x (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa); E_yC_x (broj listova) i E_yC_x (ukupna lisna površina, suha masa ili svježa masa).

Statistički postupci

60. Cilj je dobiti kvantitativni odnos koncentracija-odgovor regresijskom analizom. Ako se provede linearizacijska pretvorba podataka odgovora, npr. u jedinice probit, logit ili Weibullova modela (13), može se provesti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije koji se bolje nose s neizbježnim nepravilnostima podataka i odstupanjima od pravilnih razdioba. S približavanjem nultoj ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti pretvorbom mogu i dodatno povećati te tako otežati analizu (13).

▼M6

Valja napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti dobivene pretvorbom (probit, logit ili Weibull) namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i moraju se posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi pod (14) (15) i (16).

61. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira potrebno je izračunati procjene točaka za vrijednosti EC_x na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Po mogućnosti, za sve procjene treba odrediti granice pouzdanosti 95 %. Valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom procjenjuje se grafički ili statistički. Regresijsku analizu treba provesti na temelju pojedinačnih odgovora u ponavljanjima, a ne na temelju srednjih vrijednosti ispitnih skupina.

62. Ako raspoloživi regresijski modeli/metode nisu prikladni za podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”) (17).

63. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je usporediti srednje vrijednosti obrada primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti s kontrolnom srednjom vrijednošću primjenom odgovarajuće metode višestruke usporedbe ili testa trenda. Ovdje može biti koristan Dunnettov ili Williamsov test (18) (19) (20) (21). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka homogenosti varijanci ANOVA-e. To se može učiniti grafički ili formalnim testom (22). Prikladni su Leveneov ili Bartlettov test. Ako pretpostavka homogenosti varijanci nije zadovoljena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom pretvorbom podataka. Ako je heterogenost varijance prevelika da bi se mogla ispraviti pretvorbom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonckheereovi testovi trenda postupnim snižavanjem. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (16).

64. Novije znanstvene spoznaje rezultirale su preporukom da se pojam NOEC-a napusti i zamijeni procjenama točaka EC_x dobivenih regresijom. Za ovaj test *Lemna* spp. nije utvrđena određena vrijednost x. Ipak, čini se da je primjereno područje od 10 do 20 % (ovisno o odabranoj varijabli odgovora), a poželjno je da se navedu obje vrijednosti, EC_{10} i EC_{20}.

Izvješćivanje

65. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalno stanje i fizikalno-kemijska svojstva, uključujući granicu topljivosti u vodi,

— podaci za identifikaciju kemikalije (npr. CAS broj), uključujući čistoću (nečistoće).

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, klon (ako je poznat) i izvor.

Uvjeti ispitivanja:

— primijenjeni ispitni postupak (statički, polustatički ili protočni),

— datum početka ispitivanja i trajanje,

— ispitni medij,

— plan pokusa: ispitne posude i pokrovi, volumeni otopina, broj kolonija i listova po ispitnoj posudi na početku ispitivanja,

— ispitne koncentracije (nazivne ili izmjerene, ovisno o slučaju) i broj ponavljanja po koncentraciji,

▼**M6**

— način pripreme radnih i ispitnih otopina, uključujući eventualnu uporabu otapala ili dispergenata,

— temperatura tijekom ispitivanja,

— izvor svjetlosti, intenzitet svjetlosti i homogenost,

— pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medija,

— koncentracije ispitivane kemikalije i analitička metoda s odgovarajućim podacima za ocjenu kakvoće (validacijska istraživanja, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

— metode određivanja broja listova i drugih mjernih varijabli, npr. suhe mase, svježe mase ili lisne površine,

— eventualna odstupanja od ispitne metode.

Rezultati:

— sirovi podaci: broj listova i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi kod svakog promatranja i analize,

— srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,

— krivulje rasta za svaku koncentraciju (preporučljivo s logaritamski transformiranom mjernom varijablom, vidjeti odjeljak 55.),

— vrijeme udvostručenja / brzina rasta u kontroli na temelju broja listova,

— izračunane varijable odgovora za svako ponavljanje u ispitnim skupinama, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije ponavljanja,

— grafički prikaz odnosa koncentracija/učinak,

— procjene krajnjih točaka toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} i pripadajući intervali pouzdanosti. LOEC i/ili NOEC, ako su izračunati, i statističke metode koje su upotrijebljene za njihovo određivanje,

— ako se primjenjuje ANOVA, veličina učinka koja se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— eventualna stimulacija rasta u bilo kojoj obradi,

— svi vidljivi znakovi fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim otopinama,

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na rezultate ispitivanja nastao zbog odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

(1) ASTM International. (2003.) Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponovno odobreno 1998.). str. 733. – 742. U: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996.) OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. str. 8.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996.) XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. str. 10.

(4) SSI –Swedish Standards Institute. (1995.) Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. str. 15. (na švedskom).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999.) Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – str. 120.

(6) Environment Canada. (1993.) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. i Lacey R. (1999.) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(8) OECD (2000.) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977.) A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. Rujan 1977.

(11) Lockhart, W. L., Billeck, B. N. i Baron, C. L. (1989.) Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 – 359.

(12) Huebert, D. B. i Shay, J. M. (1993.) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481 – 483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984.): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713 – 718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P. S., Kusk, K. O. i Christensen, E. R. (1992.): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157 – 167.

(15) Bruce, R. D. i Versteeg, D. J. (1992.) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485 – 1494.

(16) OECD. (2006.) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King, T. J. (1988.) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C. W. (1955.) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096 – 1121.

(19) Dunnett, C. W. (1964.) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482 – 491.

(20) Williams, D. A. (1971.) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103 – 117.

(21) Williams, D. A. (1972.) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519 – 531.

(22) Brain, P. i Cousens, R. (1989.) An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93 – 96.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode primjenjuju se sljedeće definicije i skraćenice:

Biomasa je suha masa žive tvari u populaciji. U ovoj se metodi u pravilu mjere zamjenski parametri biomase kao što je broj listova ili lisna površina pa se izraz „biomasa” odnosi i na te zamjenske mjere.

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Kloroza je žućenje lisnog tkiva.

Klon je organizam ili stanica nastala od jedne jedinke nespolnim razmnožavanjem. Prema tomu, jedinke potekle od istog klona genetski su istovjetne.

Kolonija znači svi listovi majke i kćeri (obično dva do četiri) koji su međusobno spojeni. Ponekad se naziva i biljkom.

EC_x je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja rezultira x-postotnim (npr. 50 %) smanjenjem rasta *Lemna* unutar određenog razdoblja izlaganja (koje treba izričito navesti ako je različito od punog odnosno uobičajenog trajanja ispitivanja). Da bi se nedvosmisleno pokazalo je li vrijednost EC dobivena iz brzine rasta ili iz prirasta, za brzinu rasta upotrebljava se simbol „E_rC”, a za prirast simbol „E_yC”, iza čega se navodi mjerna varijabla, npr. E_rC (broj listova).

Protočno ispitivanje je ispitivanje u kojem se ispitne otopine stalno zamjenjuju.

List je zasebna/pojedinačna „listasta” struktura vodene leće. To je najmanja reproduktivno sposobna jedinica, odnosno jedinka.

Nabreklina su grbavi ili nabrekli listovi.

Rast je povećanje mjerne varijable, npr. broja listova, suhe mase, mokre mase ili lisne površine, u razdoblju ispitivanja.

Brzina rasta (prosječna specifična brzina rasta) logaritamsko je povećanje biomase tijekom razdoblja izlaganja.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija kemikalije kod koje je uočen statistički značajan usporavajući učinak na rast (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a moraju imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je zabilježen pri LOEC-u. Ako se ova dva uvjeta ne mogu zadovoljiti, treba navesti detaljno obrazloženje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a).

Mjerna varijabla je bilo koja varijabla koja se mjeri kako bi se izrazila krajnja točka ispitivanja primjenom jedne ili više varijabli odgovora. Mjerne su varijable kod ove metode broj listova, lisna površina, svježa masa i suha masa.

Monokultura je kultura koja sadržava jednu biljnu vrstu.

Nekroza je mrtvo (tj. bijelo ili vodom natopljeno) lisno tkivo.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

Fenotip su vidljive značajke organizma određene interakcijom njegovih gena i okoliša.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje mjerene varijable koja opisuje biomasu primjenom različitih računskih metoda. Kod ove su metode brzine rasta i prirast varijable odgovora izvedene iz mjernih varijabli kao što su broj listova, lisna površina, svježa masa i suha masa.

▼**M6**

Polustatičko ispitivanje (ispitivanje s obnavljanjem) je ispitivanje u kojemu se ispitna otopina zamjenjuje periodički, u određenim razmacima, tijekom ispitivanja.

Statičko ispitivanje ispitna je metoda kod koje se ispitna otopina ne obnavlja tijekom ispitivanja.

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

Krajnja točka ispitivanja je opći faktor koji se mijenja u odnosu na kontrolu zbog djelovanja ispitivane kemikalije kao cilj ispitivanja. Kod ove je ispitne metode krajnja točka ispitivanja inhibicija rasta koja se može izraziti različitim varijablama odgovora koje se temelje na jednoj ili više mjernih varijabli.

Ispitni medij cjelokupni je sintetički uzgojni medij u kojem ispitne biljke rastu kad se izlože ispitivanoj kemikaliji. Ispitivana se kemikalija u pravilu otapa u ispitnom mediju.

Prirast je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava razlika između biomase na kraju razdoblja izlaganja i mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja.

▼M6

Dodatak 2.

Opis *Lemna* spp.

Vodena biljka poznata pod nazivom vodena leća, *Lemna* spp., pripada porodici *Lemnaceae*, u koju se ubrajaju različite vrste diljem svijeta koje su podijeljene u četiri roda. Njihov izgled i taksonomija iscrpno su opisani (1) (2). Vrste *Lemna gibba* i *L. minor* reprezentativne su vrste umjerenih pojasa i vrlo se često upotrebljavaju u toksikološkim ispitivanjima. Obje vrste imaju plivajuću ili uronjenu diskoidnu stabljiku (list) i vrlo tanak korijen koji izbija iz sredine naličja lista. *Lemna* spp. rijetko daju cvjetove, a biljke se vegetativno razmnožavaju stvaranjem novih listova (3). Mlađe su biljke uglavnom bljeđe od starijih biljaka, imaju kraće korijenje i sastoje se od dva do tri lista različite veličine. Biljke iz ovog roda vrlo su pogodne za laboratorijsko ispitivanje zahvaljujući maloj veličini, jednostavnoj građi, nespolnom razmnožavanju i kratkom generacijskom vremenu (4) (5).

Zbog vjerojatnih razlika u osjetljivosti među vrstama, valjane su samo usporedbe osjetljivosti unutar iste vrste.

Primjeri vrsta *Lemna* upotrijebljenih u ispitivanjima: referentni popis

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996.) The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925.) The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935 – 941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996.) OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96-156. str. 8.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996.) XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995.) Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. str. 15. (na švedskom)

Lemna gibba: ASTM International. (2003.) Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponovno odobreno 1998). str. 733. – 742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996.) OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft”. EPA 712-C-96-156. str. 8.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981.) *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981.) Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993.) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T. C., Czyrska, H. (1975.) Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Izvori vrsta *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel.: +1-416-978-3641
Faks: +1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼M6

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Sjedinjene Američke Države
Tel.: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
ŠVEDSKA
Tel.: +46 8 674 7240
Faks: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Njemačka
e-mail: lemna@uba.de

LITERATURA

(1) Hillman, W. S. (1961.) The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986.) Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982.) Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986.) Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990.) Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼M6

Dodatak 3.

Održavanje radne kulture

Radne se kulture na nižoj temperaturi (4 –10 °C) mogu duže vrijeme držati bez presađivanja. Kao uzgojni medij za radne kulture *Lemna* može se upotrijebiti medij koji se upotrebljava u ispitivanju, ali moguće je upotrijebiti i druge medije bogate nutrijentima.

Određeni broj mladih svijetlozelenih biljaka povremeno se premješta u nove uzgojne posude sa svježim medijem primjenom aseptičkih postupaka. U hladnijim uvjetima, kakvi se ovdje preporučuju, presađivanje se može provoditi u razmacima do tri mjeseca.

Upotrebljavaju se kemijski čiste (očišćene kiselinom) i sterilne staklene uzgojne posude, a kod rukovanja se primjenjuju aseptički postupci. Ako dođe do onečišćenja radne kulture npr. algama ili gljivicama, treba poduzeti potrebne mjere za uklanjanje onečišćujućih organizama. U slučaju algi i većine drugih onečišćujućih organizama to se može postići površinskom sterilizacijom. Uzme se uzorak onečišćenog biljnog materijala i odreže se korijenje. Materijal se zatim snažno protrese u čistoj vodi i uroni u 0,5-postotnu (v/v) otopinu natrijeva hipoklorita na između 30 sekundi i pet minuta. Biljni se materijal zatim ispere sterilnom vodom i prenese u više šarži u uzgojne posude koje sadržavaju svježi uzgojni medij. U ovom će postupku mnogi listovi uginuti, posebno kod dužeg vremena izlaganja, ali bi barem neki od preživjelih trebali biti čisti. Oni se zatim ponovno mogu upotrijebiti za inokuliranje novih kultura.

▼M6

Dodatak 4.

Mediji

Za vrste *L. minor* i *L. gibba* preporučuju se različiti uzgojni mediji. Za *L. minor* preporučuje se prilagođena varijanta medija prema švedskoj normi (SIS), a za *L. gibba* medij 20X AAP. Sastav tih dvaju medija naveden je u nastavku. Kod pripreme tih medija treba upotrijebiti reagens odnosno analitički čiste kemikalije i deioniziranu vodu.

Uzgojni medij *Lemna* prema švedskoj normi (SIS)

— Radne otopine od I. do V. steriliziraju se obradom u autoklavu (120 °C, 15 minuta) ili membranskom filtracijom (veličina pora oko 0,2 μm).

— Otopina VI. (i fakultativno VII.) sterilizira se isključivo membranskom filtracijom; ne smije se obrađivati u autoklavu.

— Sterilne radne otopine treba čuvati na hladnom i mračnom mjestu. Radne otopine od I. do V. treba baciti nakon šest mjeseci, dok otopina VI. (i fakultativno VII.) ima rok uporabe jedan mjesec.

Radna otopina br.	Tvar	Koncentracija u radnoj otopini (g/l)	Koncentracija u pripremljenom mediju (mg/•l)	Pripremljeni medij	
				Element	Koncentracija (mg/•l)
I.	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III.	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV.	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V.	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI.	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII.	MOPS (pufer)	490	490	—	—

Da bi se dobila jedna litra medija SIS, u 900 ml deionizirane vode dodaje se:

▼**M6**

— 10 ml radne otopine I.

— 5 ml radne otopine II.

— 5 ml radne otopine III.

— 5 ml radne otopine IV.

— 1 ml radne otopine V.

— 5 ml radne otopine VI.

— 1 ml radne otopine VII. (fakultativno).*Napomena*: Za ispitivanje nekih kemikalija može biti potrebna i radna otopina VII. (pufer MOPS) (vidjeti stavak 11.).

pH-vrijednost prilagodi se na 6,5 ± 0,2 s pomoću 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH i nadopuni deioniziranom vodom do volumena od jedne litre.

Uzgojni medij 20X AAP

Radne otopine pripremaju se u sterilnoj destiliranoj ili deioniziranoj vodi.

Sterilne radne otopine treba čuvati na hladnom i mračnom mjestu. U tim će uvjetima radne otopine imati rok uporabe najmanje šest do osam tjedana.

Za medij 20X – AAP priprema se pet radnih otopina s nutrijentima (A1, A2, A3, B i C) uporabom reagencijski čistih kemikalija. Uzgojni medij dobije se tako da se u približno 850 ml deionizirane vode doda po 20 ml svake od radnih otopina s nutrijentima. pH-vrijednost prilagodi se na 7,5 ± 0,1 s pomoću 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH i nadopuni deioniziranom vodom do volumena od jedne litre. Zatim se medij profiltrira u sterilnu posudu kroz membranski filtar 0,2 μm (približno).

Uzgojni medij za ispitivanje treba pripremiti jedan do dva dana prije uporabe kako bi se stabilizirala pH-vrijednost. pH-vrijednost uzgojnog medija treba provjeriti prije uporabe i prema potrebi prilagoditi dodavanjem 0,1 ili 1 mol NaOH ili HCl na način opisan ranije u tekstu.

Radna otopina br.	Tvar	Koncentracija u radnoj otopini (g/•l) (*)	Koncentracija u pripremljenom mediju (mg/•l) (*)	Pripremljeni medij	
				Element	Koncentracija (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2.O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Radna otopina br.	Tvar	Koncentracija u radnoj otopini (g/•l) (*)	Koncentracija u pripremljenom mediju (mg/•l) (*)	Pripremljeni medij	
				Element	Koncentracija (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; N	220; 43

(*) Ako nije navedeno drukčije.

Napomena: teoretski primjerena konačna koncentracija bikarbonata (kojom se izbjegava znatna prilagodba pH-a) iznosi 15 mg/l, a ne 300 mg/l (I.Sims, P.Whitehouse i R.Lacev (1999). The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Medij STEINBERG (prema ISO 20079)

Koncentracije i radne otopine

Prilagođeni medij Steinberg u ISO 20079 predviđen je samo za *Lemna minor* (budući da je ondje jedino i dopuštena *Lemna minor*), ali ispitivanja su pokazala da se i s vrstom *Lemna gibba* mogu postići dobri rezultati.

Kod pripreme medija treba upotrijebiti reagencijski odnosno analitički čiste kemikalije i deioniziranu vodu.

Hranjivi se medij priprema iz radnih otopina ili deseterostruko koncentriranog medija kako bi se dobila najviša koncentracija medija koja se može postići bez taloženja.

Tablica 1.

pH-stabilizirani medij STEINBERG (modificiran prema Altenburgeru)

Sastojak		Hranjivi medij	
Makroelementi	molarna masa	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Sastojak		Hranjivi medij	
Mikroelementi	molarna masa	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dinatrijev dihidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tablica 2.

Radne otopine (makroelementi)

1. Makroelementi (pedeseterostruko koncentrirani)	**g/l**
Radna otopina 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Radna otopina 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Radna otopina 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tablica 3.

Radne otopine (mikroelementi)

2. Makroelementi (tisućostruko koncentrirani)	**mg/l**
Radna otopina 4:	
H_3BO_3	120,0
Radna otopina 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Radna otopina 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Radna otopina 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Radna otopina 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinatrijev dihidrat	1 500,00

— Radne otopine 2 i 3 mogu se objediniti, kao i radne otopine od 4 do 7 (uzimajući u obzir tražene koncentracije).

▼**M6**

— Za duži rok uporabe radne otopine potrebno je obraditi u autoklavu 20 minuta na temperaturi od 121 °C ili provesti sterilnu filtraciju (0,2 μm). Za radnu otopinu 8 u svakom se slučaju preporučuje sterilna filtracija (0,2 μm).

Priprema konačne koncentracije (modificiranog) medija STEINBERG

— Potrebno je dodati 20 ml radnih otopina 1, 2 i 3 (vidjeti tablicu 2.) u oko 900 ml deionizirane vode kako bi se izbjeglo taloženje.

— Doda se 1,0 ml radnih otopina 4, 5, 6, 7 i 8 (vidjeti tablicu 3.).

— pH-vrijednost mora biti 5,5 +/– 0,2 (prilagoditi dodavanjem minimalnog volumena otopine NaOH ili HCl).

— Nadopuni se vodom do 1 000 ml.

— Ako su radne otopine sterilizirane i upotrebljava se prikladna voda, nije potrebna dodatna sterilizacija. Ako se sterilizacija provodi na konačnom mediju, radnu otopinu 8 treba dodati nakon obrade u autoklavu (20 minuta na 121 °C).

Priprema deseterostruko koncentriranog (modificiranog) medija STEINBER za međuskladištenje

— Potrebno je dodati 20 ml radnih otopina 1, 2 i 3 (vidjeti tablicu 2.) u oko 30 ml vode kako bi se izbjeglo taloženje.

— Doda se 1,0 ml radnih otopina 4, 5, 6, 7 i 8 (vidjeti tablicu 3.). Nadopuni se vodom do 100 ml.

— Ako su radne otopine sterilizirane i upotrebljava se prikladna voda, nije potrebna dodatna sterilizacija. Ako se sterilizacija provodi na konačnom mediju, radnu otopinu 8 treba dodati nakon obrade u autoklavu (20 minuta na 121 °C).

— pH-vrijednost medija (konačna koncentracija) mora biti 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TEST TOKSIČNOSTI TRZALACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA SA SEDIMENTOM OBRAĐENIM SPIKINGOM

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 218 (2004). Ova ispitna metoda namijenjena je procjeni učinaka produljenog izlaganja kemikalija ličinkama iz sedimenta vrste slatkovodnih dvokrilaca (diptera) *Chironomus* sp. Temelji se na postupcima postojećih testova toksičnosti za *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans* koji su razvijeni u Europi (1)(2)(3) i Sjevernoj Americi (4)(5)(6)(7)(8) i ispitani u prstenastom testu (1)(6)(9). Mogu se koristiti i druge vrste trzalaca o kojima postoji dobra dokumentacija, npr. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Scenarij izlaganja koji se koristi u ovoj ispitnoj metodi jest obogaćivanje sedimenta ispitnom tvari spikingom. Odabir prikladnog scenarija izlaganja ovisi o cilju provođenja testa. Cilj scenarija obogaćivanja sedimenta spikingom jest simulirati akumulirane razine kemikalija koje postoje u sedimentu. Ovaj sustav izlaganja obuhvaća spiking sedimenta iz ispitnog sustava sediment/voda.

3. Tvari koje treba ispitati na organizme koji žive u sedimentu obično u njemu opstaju tijekom duljih razdoblja. Organizmi iz sedimenta mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno da bi svaki od tih načina pridonio općim učincima toksičnosti ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima predmetne kemikalije. Za jako adsorptivne tvari (npr. s log K_{ow} > 5) ili za tvari koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama, značajan način izlaganja može biti gutanje kontaminirane hrane. Kako se ne bi podcijenila toksičnost jako lipofilnih tvari, može se u obzir uzeti uporaba hrane koja se dodaje sedimentu prije primjene ispitivane tvari. Da bi se u obzir uzeli svi potencijalni načini izlaganja, ova se ispitna metoda usredotočuje na dugotrajno izlaganje. Test traje u rasponu od 20 - 28 dana za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, te 28 - 65 dana za *C. tentans*. Ako su za neku specifičnu svrhu potrebni kratkotrajni podaci, primjerice radi istraživanja učinaka neke nestabilne kemikalije, višestruka određivanja mogu se ukinuti nakon deset dana.

4. Izmjereni konačni učinci jesu ukupni broj odraslih životinja preobraženih u vrijeme preobrazbe. Preporučuje se da se preživljavanje i rast ličinki mjere tek nakon deset dana ako su potrebni dodatni kratkotrajni podaci, i to pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to prikladno.

5. Preporučuje se uporaba formuliranog sedimenta. Formulirani sediment ima nekoliko prednosti nad prirodnim sedimentima:

   — pokusna varijabilnost je smanjena jer stvara mjerno obnovljivu „standardiziranu matricu” te se eliminira potreba za pronalaženjem nekontaminiranih i čistih izvora sedimenta;

   — testovi se mogu provoditi u bilo koje doba, a da se pritom ne suočava sa sezonskom varijabilnošću u ispitnom sedimentu, a nema ni potrebe za prethodnom obradom sedimenta radi uklanjanja urođene faune; uporaba formuliranog sedimenta također snižava troškove povezane s terenskim prikupljanjem dovoljnih količina sedimenta za rutinsko testiranje;

   — uporaba formuliranog sedimenta omogućuje usporedbe toksičnosti i razvrstavanje tvari sukladno tome.

6. Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

▼M4

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ličinke trzalaca u prvom stadiju razvoja izlažu se rasponu koncentracija ispitne kemikalije u sustavima sediment/voda. Ispitna tvar dodaje se u sediment, a nakon toga se ličinke u prvom stadiju razvoja uvode u ispitne laboratorijske čaše, u kojima su već stabilizirane koncentracije sedimenta i vode. Na kraju testa mjeri se brzina preobrazbe i razvoja trzalaca. Također se mogu mjeriti i preživljavanje i masa ličinki nakon deset dana, ako je to potrebno (pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je primjereno). Ti se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize s ciljem određivanja koncentracije koja bi izazvala × % smanjenje u preobrazbi ili preživaljavanju i rastu ličinki (npr. EC_{15}, EC_{50} itd.) bilo statističkim hipotetskim testiranjem s ciljem određivanja NOEC-a/LOEC-a. Za potonje je potrebna usporedba vrijednosti učinka s kontrolnim vrijednostima pomoću statističkih testova.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

8. Trebali bi biti poznati topljivost ispitivane tvari u vodi, njezin tlak pare, izmjerena ili izračunata razdioba u sedimentu i stabilnost u vodi i sedimentu. Treba biti dostupna pouzdana analitička metoda kvantifikacije ispitivane tvari u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i sedimentu, zajedno s poznatom i prijavljenom preciznošću i granicama detekcije. Korisne informacije obuhvaćaju strukturnu formulu i čistoću ispitivane tvari. Korisna informacija je još i kemijska sudbina ispitivane tvari (npr. rasipanje, abiotička i biotička razgradnja itd.). Daljnje smjernice za testiranje tvari čija su fizikalno-kemijska svojstva takva da je zbog njih teško provoditi testove nalaze se u (12).

REFERENTNE KEMIKALIJE

9. Referentne kemikalije mogu se ispitivati periodično kako bi se osigurala pouzdanost protokola i uvjeta ispitivanja. Primjeri referentnih toksičnih tvari koji se uspješno koriste u prstenastim testovima i validacijskim studijama jesu: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid i kalijev klorid (1)(2)(5)(6)(13).

VALJANOST ISPITIVANJA

10. Da bi test bio valjan, primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— postotak preobrazbe u kontrolnim posudama mora na kraju testa iznositi najmanje 70 %. (1)(6);

— preobrazba vrsti C. riparius i C. yoshimatsui u odrasle životinje u kontrolnim posudama treba se odviti između 12. i 23. dana nakon njihova umetanja u posude; za vrstu *C. tentans* potrebno je razdoblje od 20 do 65 dana.

— na kraju testa treba u svakoj posudi izmjeriti pH i koncentraciju otopljenog kisika. Koncentracija kisika treba iznositi najmanje 60 posto vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV) na određenoj temperaturi, a pH vode iznad sedimenta treba biti u rasponu od 6-9 u svim ispitnim posudama;

— temperatura vode ne bi se smjela razlikovati za više od ± 1,0 °C. Temperatura vode može se kontrolirati izotermičkom sobom i u tom slučaju temperatura u prostoriji treba se potvrđivati u odgovarajućim vremenskim razmacima.

▼M4

OPIS METODE

Ispitne posude

11. Studija se provodi u staklenim laboratorijskim čašama od 600 ml promjera 8 cm. Prikladne su i druge posude, ali se mora zajamčiti da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. Površina sedimenta mora biti dovoljno velika da po svakoj ličinki bude 2 do 3 cm^2 površine. Omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba biti 1:4. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u doticaj sa sustavom ispitivanja treba biti načinjena u cijelosti od stakla ili nekog drugog kemijski inertnog materijala (npr. teflona).

Odabir vrste

12. Vrsta koju treba koristiti u ovom testu po mogućnosti je *Chironomus riparius*. I vrsta *Chironomus tentans* također je prikladna, ali je njome teže rukovati te je za nju potrebno dulje vrijeme ispitivanja. Može se koristiti i vrsta *Chironomus yohimatsui*. Pojedinosti o metodi uzgoja kulture nalaze se u Dodatku 2. za vrstu *Chironomus riparius*. Podaci o uvjetima uzgoja kulture dostupni su također i za druge vrste, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yoshimatsui* (11). Mora se potvrditi identifikacija vrste prije ispitivanja, ali to nije potrebno prije svakog ispitivanja ako organizmi potječu iz kulture uzgojene u laboratoriju.

Sediment

13. Po mogućnosti bi se trebao koristiti formulirani sediment (zvan još i obrađeni, umjetni ili sintetički sediment). Međutim, ako se koristi prirodni sediment, on se treba karakterizirati (barem pH, sadržaj otopljenog ugljika, a preporučuje se i određivanje drugih parametara kao što su omjer C/N i granulometrija) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli natjecati sa ili jesti trzalce. Također se preporučuje da se prirodni sediment, prije uporabe u testu toksičnosti trzalaca, prethodno priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Za uporabu u ovom ispitivanju preporučuje se sljedeći formulirani sediment, na temelju umjetnog tla iz ispitne metode C.8 (14), (1)(15)(16):

(a) 4-5 % (suhe mase) treseta: što je moguće bliže pH od 5,5 do 6,0; važno je da se koristi treset u obliku praha, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 1 mm) i isključivo sušen na zraku.

(b) 20 % (suhe mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %).

(c) 75-76 % (suhe mase) kremenog pijeska (fini bi pijesak trebao prevladavati s više od 50 posto čestica između 50 i 200 μm).

(d) Dodaje se deionizirana voda kako bi se dobio sadržaj vlage konačne smjese u rasponu od 30 - 50 %.

(e) Dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kakvoće ($CaCO_3$) kako bi se pH konačne smjese sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5. Sadržaj organskog ugljika konačne smjese trebao bi iznositi 2 % (± 0,5 %) i treba se prilagoditi dodavanjem odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c).

14. Treba biti poznat izvor treseta, kaolinitske gline i pijeska. Treba provjeriti nisu li komponente sedimenta kemijski kontaminirane (npr. teški metali, organoklorni spojevi, organofosforni spojevi itd.). Primjer pripreme formuliranog sedimenta opisan je u Dodatku 3. I miješanje suhih sastojaka također je prihvatljivo ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. lebdenje čestica treseta) i da su treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljeni.

▼M4

Voda

15. Kao ispitna voda prikladna je svaka voda koja ima kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje koja su navedena u dodacima 2. i 4. Kao voda za uzgoj kultura i ispitna voda prikladna je svaka prikladna voda, prirodna voda (površinske ili podzemne vode), obrađena voda (vidjeti Dodatak 2.) ili dekolorirana voda iz slavine ako će trzalci u njoj preživjeti tijekom uzgoja kulture i ispitivanja, a da ne pokažu nikakve znakove stresa. Na početku testa pH ispitne vode treba biti između 6 i 9, a ukupna tvrdoća ne viša od 400 mg/l kao $CaCO_3$. Međutim, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane tvari, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (samim time, u toj se situaciji ne smije koristiti medij Elendt M4). Tijekom cijele studije trebalo bi koristiti istu vrstu vode. Najmanje dvaput godišnje ili kada se sumnja da su se svojstva kakvoće vode navedena u Dodatku 4. značajno promijenila, treba izmjeriti ta svojstva.

Radne otopine - sedimenti obrađeni spikingom

16. Sedimenti obrađeni spikingom odabrane koncentracije obično se pripremaju dodavanjem otopine ispitivane tvari izravno u sediment. Radna otopina ispitivane tvari otopljena u deioniziranoj vodi miješa se s formuliranim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana tvar slabo topljiva u vodi, može se otopiti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog otapala (npr. heksan, aceton ili klorofor). Ta se otopina potom miješa s 10 g finog kremenog pijeska za jednu ispitnu posudu. Otapalo se pusti da ispari i mora se u cijelosti ukloniti iz pijeska; potom se pijesak miješa s prikladnom količinom sedimenta po ispitnoj laboratorijskoj čaši. Samo lako hlapljiva sredstva mogu se koristiti za otapanje, dispergiranje ili emulgiranje ispitivane tvari. Treba imati na umu da se pijesak koji nastane miješanjem ispitivane tvari i pijeska mora uzeti u obzir prilikom pripreme sedimenta (tj. sediment stoga treba pripremiti s manje pijeska). Treba se pobrinuti da se ispitivana tvar koja se dodaje u sediment temeljito i ravnomjerno raspršiu sedimentu. Ako je potrebno, mogu se analizirati i poduzorci kako bi se odredio stupanj homogenosti.

PLAN ISPITIVANJA

17. Plan ispitivanja odnosi se na odabir broja i raspored ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju i na broj ličinki po posudi. Opisani su planovi za procjenu točke koncentracije s učinkom (EC), za procjenu najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) i za provođenje graničnog ispitivanja.

Plan za regresijsku analizu

18. Koncentracija s učinkom (npr. EC_{15}, EC_{50}) i raspon koncentracije, iznad kojega je učinak ispitivane tvari od interesa, trebaju obuhvaćati koncentracije uključene u ispitivanje. Općenito, preciznost, a posebno valjanost, s kojom se mogu procijeniti koncentracije s učinkom (EC_x), poboljšavaju se kad se koncentracija s učinkom nalazi unutar raspona ispitnih koncentracija. Treba izbjegavati ekstrapolaciju ispod najniže pozitivne koncentracije ili iznad najviše koncentracije. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona korisno je za odabir raspona koncentracija koji će se koristiti (vidjeti stavak 27.).

▼M4

19. Ako treba procijeniti EC_x, treba ispitati najmanje pet koncentracija i tri višestruka određivanja. U svakom se slučaju savjetuje korištenje dovoljnog broja ispitnih koncentracija kako bi se dobila dobra procjena modela. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (iznimka se može učiniti u slučajevima kada krivulja odgovora na dozu ima plitak nagib). Broj višestrukih određivanja u svakom tretmanu može se sniziti ako se poveća broj ispitnih koncentracija različitog odgovora. Povećanjem broja višestrukih određivanja ili smanjivanje trajanja intervala ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti. Dodatna višestruka određivanja potrebna su ako treba procijeniti 10 - dnevno preživljavanje i rast ličinki.

Plan za procjenu NOEC-a/LOEC-a

20. Ako treba procijeniti LOEC (najnižu koncentraciju s vidljivim učinkom) i NOEC (najvišu koncentraciju bez vidljivog učinka), treba koristiti pet ispitnih koncentracija u najmanje četiri višestruka određivanja, a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva. Broj višestrukih određivanja trebao bi biti dovoljan da osigura adekvatnu statističku snagu kojom će otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri razini značajnosti od 5 % ($p = 0,05$). Kod brzine razvoja obično je prikladna analiza varijance (ANOVA), kao što su Dunnettov test i Williamsov test (17)(18)(19)(20). Kod omjera preobrazbe mogu se koristiti Cochran-Armitageov test, Fisherov test (s Bonferronijevom korekcijom) ili Mantel-Haenszelov test.

Granično ispitivanje

21. Može se provesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrolna posuda) ako se u preliminarnom testu za određivanje raspona ne vide nikakvi učinci. Svrha graničnog ispitivanja jest provesti ispitivanje na koncentracijama dovoljno visokim da omogući donositeljima odluke da isključe moguće toksične učinke ispitivane tvari, a granica se postavlja na koncentraciju za koju se ne očekuje da će se pojaviti u bilo kojoj situaciji. Preporučuje se 1 000 mg/kg (suha masa). Obično je potrebno najmanje šest višestrukih određivanja i za ispitnu i za kontrolnu posudu. Treba pokazati adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri razini značajnosti od 5 % ($p = 0,05$). Kod metričkog odgovora (brzina razvoja i masa) t-test je prikladna statistička metoda ako podaci zadovoljavaju zahtjeve tog testa (normalnost, homogene varijance). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, mogu se koristiti t-test nejednake varijance ili neparametarski test, kao što je Wilcoxon-Mann-Whitheyev test. Kod omjera preobrazbe prikladan je Fisherov test.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Priprema sustava sediment/voda spikingom

22. Postupak spikinga opisan u ispitnoj metodi C.8: Toksičnost za gujavice preporučuje se za primjenu ispitivane tvari (14). Sedimenti obrađeni spikingom stavljaju se u posude pa se dodaje voda iznad sedimenta, i to u omjeru sedimenta i vode 1:4 (vidjeti stavke 11. i 15.). Dubina sloja sedimenta trebala bi se kretati u rasponu od 1,5 - 3 cm. Da bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendiranje finog materijala tijekom dodavanja ispitne vode u vodeni stupac, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega lijeva voda, a disk se miče odmah nakon toga. Mogu biti prikladni i drugi predmeti.

23. Ispitne posude bi trebale biti pokrivene (npr. staklenim pločama). Ako je potrebno, tijekom studije se u izvorni volumen vode nadolijeva još vode kako bi se nadomjestilo isparavanje vode. To bi se trebalo činiti pomoću destilirane ili deionizirane vode kako bi se spriječilo stvaranje soli.

▼M4

Stabilizacija

24. Kad se pripremi sediment postupkom spikinga s vodom iznad sedimenta, poželjno je dopustiti razdiobu ispitivane tvari iz tekućeg stanja u sediment (3)(4)(6)(13). To bi se po mogućnosti trebalo učiniti u uvjetima temperature i dozračivanja koji se koriste u ispitivanju. Prikladno vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i kemikaliju, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, pa čak u rijetkim slučajevima i do nekoliko tjedana (4-5 tjedana). Budući da je time ostavljeno dovoljno vremena za razgradnju brojnih kemikalija, ne čeka se uravnoteženje, ali se preporučuje vrijeme uravnoteženja od 48 sati. Na kraju tog dodatnog vremena uravnoteženja treba izmjeriti koncentraciju ispitivane tvari u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i u sedimentu, barem u najvišoj koncentraciji i u jednoj nižoj (vidjeti stavak 38.). Ta analitička određivanja ispitivane tvari omogućuju izračun bilance mase i izražavanje rezultata na temelju izmjerenih koncentracija.

Dodavanje ispitnih organizama

25. Četiri do pet dana prije dodavanja ispitnih organizama u ispitne posude, mase jajašaca bi se trebale izvaditi iz kultura i staviti u male posude u hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Mogu se koristiti stara hranjiva podloga iz matične kulture ili svježe pripremljena hranjiva podloga za uzgoj kulture. Ako se koristi potonja, hranjivoj podlozi za uzgoj kulture treba dodati manju količinu hrane, npr. zelenih algi i/ili nekoliko kapljica suspenzije fino usitnjenih pahuljica riblje hrane (vidjeti Dodatak 2.). Treba koristiti samo svježe položene mase jajašaca. Valjenje ličinki obično počinje nekoliko dana nakon polaganja jajašaca (2 do 3 dana za *Chironomus riparius* na 20 °C i 1 do 4 dana za *Chironomus tentans* na 23 °C i za *Chironomus yoshimatui* na 25 °C), a ličinke se razvijaju u četiri stadija razvoja, od kojih svaki traje 4-8 dana. U ispitivanju treba koristiti ličinke iz prvog stadija razvoja (2-3 ili 1-4 dana poslije valjenja). Stadij mušica moguće je provjeriti pomoću širine kapsule glave (6).

26. Dvadeset ličinki iz prvog stadija razvoja stavljaju se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava vodu i sediment obrađen spikingom, i to pomoću tupe pipete. Treba zaustaviti dozračivanje vode tijekom dodavanja ličinki u ispitne posude i tako treba ostati još 24 sata nakon dodavanja ličinki (vidjeti stavke 25. i 32.). Prema upotrijebljenom planu ispitivanja (vidjeti stavke 19. i 20.) broj ličinki po koncentraciji iznosi najmanje 60 za procjenu točke EC-a i 80 za određivanje NOEC-a.

Ispitne koncentracije

27. Ispitivanje za određivanje raspona može biti korisno za određivanje raspona koncentracija za konačno ispitivanje. U tu se svrhu koristi niz široko razmaknutih koncentracija ispitivane tvari. Da bi se dobila ista gustoća površine po trzalcu, koja će se koristiti i u konačnom ispitivanju, trzalci se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane tvari tijekom vremena koje omogućuje procjenu odgovarajućih ispitnih koncentracija, a nisu potrebna višestruka određivanja.

28. O ispitnim koncentracijama za konačno ispitivanje odlučuje se na temelju rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Trebalo bi koristiti i odabrati najmanje pet koncentracija, kao što je to opisano u stavcima 18. do 20.

▼M4

Kontrolne posude

29. U ispitivanje bi, s odgovarajućim brojem višestrukih određivanja, trebalo uključiti kontrolne posude bez ispitivane tvari, ali sa sedimentom (vidjeti stavke 19.-20.). Ako se za primjenu ispitivane tvari koristilo otapalo (vidjeti stavak 16.), treba dodati i kontrolnu posudu s otapalom sedimenta.

Sustav ispitivanja

30. Koriste se statički sustavi. Polustatični ili protočni sustavi sa stalnim ili isprekidanim obnavljanjem vode iznad sedimenta mogu se koristiti u iznimnim slučajevima, na primjer ako specifikacije kakvoće vode postanu neprikladne za ispitni organizam ili ako utječu na uravnoteženje kemikalije (npr. ako razine otopljenog kisika previše padnu, ako se previše povisi koncentracija proizvoda izlučivanja ili ako iz sedimenta cure minerali koji utječu na pH i/ili tvrdoću vode). Međutim, obično su dostatne i daje se prednost drugim metodama poboljšanja kakvoće vode iznad sedimenta, kao što je dozračivanje.

Hrana

31. Potrebno je hraniti ličinke, po mogućnosti svakodnevno ili najmanje triput tjedno. Čini se da je riblja hrana (suspenzija u vodi fino usitnjene hrane, npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll; pojedinosti vidjeti u Dodatku 2.) u količini od 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg za *C. yoshimatui*) dnevno po ličinki prikladna za mlade ličinke prvih 10 dana. Za starije će ličinke biti potrebno malo više hrane: 0,5 - 1 mg dnevno po ličinki trebalo bi biti dostatno za ostatak ispitivanja. Porcije hrane treba smanjiti u svim tretmanima te kontrolirati rastu li gljivice i primijeti li se smrtnost u kontrolnim posudama. Ako se ne može zaustaviti rast gljivica, ispitivanje treba ponoviti. Kada se ispituju jako adsorptive tvari (npr. čiji je log K_{ow} > 5) ili tvari koje stvaraju kovalentne veze sa sedimentom, formuliranom se sedimentu prije faze stabilizacije može dodati količina hrane neophodna za osiguranje preživljavanja i prirodnog rasta organizama. U tu se svrhu, umjesto riblje hrane, mora koristiti biljni materijal, npr. može se dodati 0,5 % (suha masa) fino usitnjenog lišća npr. velike koprive (*Urtica dioica*), duda (*Morus alba*), bijele djeteline (*Trifolium repens*), špinata (*Spinacia oleracea*) ili nekog drugog biljnog materijala (*Cerophyl* ili alfa-celuloze).

Uvjeti za inkubaciju

32. Blago dozračivanje vode iznad sedimenta u ispitnim posudama osigurava se po mogućnosti 24 sata poslije dodavanja ličinki i traje tako tijekom cijelog ispitivanja (treba se pobrinuti da koncentracija otopljenog kisika ne padne ispod 60 posto ASV-a). Dozračivanje se vrši putem staklene pasterove pipete pričvršćene 2-3 cm iznad sloja sedimenta (tj. jedan ili par mjehurića/s). Pri ispitivanju hlapljivih kemikalija može se pobrinuti da se ne dozračuje sustav sediment/voda.

33. Ispitivanje se provodi na konstantnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za *C. tentans* i *C. yoshimatui* preporučene temperature su 23 °C odnosno 25 °C (± 2 °C). Koristi se fotoperiod od 16 sati, a jačina svjetlosti treba biti 500 do 1 000 luksa.

▼M4

Trajanje izlaganja

34. Izlaganje počinje dodavanjem ličinki u posude sa sedimentom obrađenim spikingom i kontrolne posude. Maksimalno trajanje izlaganja je 28 dana za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a 65 dana za *C. tentans*. Ako se ličinke prije preobraze u mušice, ispitivanje se može prekinuti nakon minimalno pet dana nakon što se i zadnja ličinka u kontrolnoj posudi preobrazi u odraslu životinju.

Promatranja

Preobrazba

35. Određuju se vrijeme razvoja i ukupni broj muških i ženskih mušica koje su se u cijelosti preobrazile. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima.

36. Ispitne posude treba promatrati najmanje triput tjedno da bi se vizualno procijenilo svako nenormalno ponašanje (npr. napuštanje sedimenta, neuobičajeno plivanje) u usporedbi s kontrolnim posudama. Tijekom razdoblja očekivane preobrazbe potrebno je svakodnevno brojati preobražene mušice. Svakodnevno se vodi evidencija i o spolu i broju preobraženih mušica. Nakon identifikacije mušice se vade iz posuda. Treba zabilježiti sve mase jajašaca položene prije prekida ispitivanja te iste treba izvaditi kako bi se spriječilo ponovno uvođenje ličinki u sediment. Također se bilježi i broj vidljivih kukuljica koje se nisu uspjele preobraziti. Smjernice o mjerenju preobrazbe navedene su u Dodatku 5.

Rast i preživljavanje

37. Ako treba dobiti podatke o 10-dnevnom preživljavanju i rastu ličinki, na samom početku treba dodatne ispitne posude kako bi ih se moglo naknadno koristiti. Sediment iz tih dodatnih posuda prosijava se kroz sito od 250 μm kako bi se zadržale ličinke. Kriteriji za smrt jesu nepomičnost ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje. I neoporavljene ličinke treba prebrojati kao mrtve (možda su mikrobi već razgradili ličinke koje su uginule na početku ispitivanja). Određuje se suha masa (bez pepela) preživjelih ličinki po svakoj ispitnoj posudi pa se izračunava srednja pojedinačna suha masa po posudi. Korisno je odrediti kojem stadiju razvoja pripadaju preživjele ličinke; za to se može upotrijebiti mjerenje širine kapsule glave svake ličinke.

Analitička mjerenja

Koncentracija ispitivane tvari

38. Prije početka ispitivanja (tj. dodavanja ličinki) vade se uzorci cjelovitog sedimenta iz najmanje jedne posude po tretmanu radi analitičkog određivanja koncentracije ispitivane tvari u sedimentu. Preporučuje se da se na početku (vidjeti stavak 24.) i na kraju ispitivanja analiziraju, kao minimum, uzorci vode iznad sedimenta, porne vode i sedimenta, i to u najvišoj koncentraciji i u nekoj nižoj. Ta određivanja koncentracije ispitivane tvari daju informacije o ponašanju/razdiobi ispitivane tvari u sustavu voda/sediment.

39. Kada se provode posredna mjerenja (npr. 7. dana) te ako su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda, a da to pritom ne utječe na sustav ispitivanja, analitička određivanja treba provoditi na uzorcima iz dodatnih ispitnih posuda koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisustvo ispitnih organizama), ali koje se ne koriste za biološka promatranja.

▼M4

40. Preporučeni postupak za izoliranje međuprostorne vode jest centrifugiranje na npr. 10 000 g i 4 °C tijekom 30 min. Međutim, ako se pokaže da se ispitivana tvar ne adsorbira na filtre, prihvatljiva bi mogla biti i filtracija. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi jer je uzorak premalen.

Fizikalno-kemijski parametri

41. Na odgovarajući način treba izmjeriti pH i temperaturu u ispitnim posudama (vidjeti stavak 10.). Tvrdoću i amonijak treba mjeriti u kontrolnim posudama i u jednoj ispitnoj posudi u najvišoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

42. Cilj ovog ispitivanja jest odrediti učinak ispitivane tvari na brzinu razvoja i ukupni broj potpuno preobraženih muških i ženskih mušica ili, u slučaju 10-dnevnog ispitivanja, učinke na preživljavanje i masu ličinki. Ako ne postoje naznake statistički različite osjetljivosti spolova, rezultati mužjaka i ženki mogu se ujediniti radi statističke analize. Razlike u osjetljivosti spolova mogu se statistički prosuditi, npr. tabličnim testom χ^2-r × 2. Preživljavanje ličinki i njihova srednja pojedinačna suha masa po posudi moraju se odrediti nakon deset dana kada je to potrebno.

43. Koncentracije s učinkom izražene i utemeljene na suhoj masi izračunavaju se po mogućnosti na temelju koncentracija u sedimentu izmjerenih na početku ispitivanja (vidjeti stavak 38.).

44. Za izračun procjene točke EC_{50} ili bilo koje druge EC_x kao dodatna ponovna određivanja mogu se koristiti statistički podaci dobiveni za svaku posudu. U izračunu intervala pouzdanosti za bilo koji EC_x u obzir treba uzeti varijabilnost između posuda ili se treba pokazati da je ta varijabilnost toliko neznatna da se može ignorirati. Kad se model prilagođava metodi najmanjih kvadrata, na statističke podatke za svaku posudu treba primijeniti transformaciju kako bi se poboljšala homogenst varijance. Međutim, vrijednosti EC_x trebale bi se izračunati tek nakon što se odgovor transformira natrag u izvornu vrijednost.

45. Kada je cilj statističke analize određivanje NOEC-a/LOEC-a testiranjem hipoteze, u obzir se mora uzeti varijabilnost među posudama, npr. ugniježđenom ANOVA-om. Kao druga mogućnost, u situacijama kada se pobiju pretpostavke uobičajene ANOVA-e, mogu biti prikladna i robusnija ispitivanja (21).

Omjer preobrazbe

46. Omjeri preobrazbe su kvantalni podaci i mogu se analizirati Cochran-Armitageovim testom koji se primjenjuje snižavanjem korak po korak kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad se ti podaci slažu s tim očekivanjem. Ako to nije slučaj, mogu se koristiti Fisherov test ili Mantel-Haenszelov test s Bonferroni-Holmovim prilagođenim p-vrijednostima. Ako ima dokaza za još veću varijabilnost između višestrukih određivanja u istoj koncentraciji nego što bi to naznačila binomijalna raspodjela (često zvana i „ekstra-binomijalna” varijacija), treba primijeniti robusni Cochran-Armitageov ili Fisherov test kakvi su predloženi u (21).

▼**M4**

Određuje se broj mušica preobraženih po posudi, n_e, koji se onda dijeli brojem uvedenih ličinki, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdje je:

ER = omjer preobrazbe

n_e = broj preobraženih mušica po posudi

n_a = broj uvedenih ličinki po posudi

47. Najprikladnija alternativa za velike uzorke, kada postoji ekstra-binomijalna varijanca, jest tretirati omjer preobrazbe kao kontinuirani odgovor te primijeniti postupke poput Williamovog testa kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad je isti u skladu s tim ER podacima. Dunnettov bi test bio prikladan gdje nema monotoničnosti. Veliki uzorak se ovdje definira kao broj preobraženih mušica i broj nepreobraženih mušica veći od pet, i to na osnovi ponovljenog određivanja (posude).

48. Za primjenu vrijednosti ANOVA vrijednosti ER-a moraju se prvo transformirati arkus sinus drugi korijen transformacijom ili Freeman-Tukeyovom transformacijom kako bi se dobila približna normalna raspodjela i ujednačile varijance. Kad se koriste apsolutne frekvencije, mogu se primijeniti Cochran-Armitageov, Fisherov (Bonferronijev) ili Mantel-Haenszelov test. Arkus sinus drugi korijen transformacija primjenjuje se tako što se uzme inverzni sinus ($\sin^{-1}$) drugog korijena ER-a.

49. Za omjere preobrazbe vrijednosti EC_x računaju se regresijskom analizom (ili npr. probit (22), logit, Weibull, prikladan komercijalni softver itd.). Ako regresijka analiza ne uspije (npr. kad imamo manje od dva djelomična odgovora), koriste se druge neparametarske metode, kao što su pomični prosjek ili jednostavna interpolacija.

Brzina razvoja

50. Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji raspon vremena između uvođenja ličinki (0. dan ispitivanja) i njihove preobrazbe u pokusnu skupinu mušica. (Za izračun stvarnog vremena razvoja u obzir treba uzeti starost ličinki u trenutku uvođenja). Brzina razvoja recipročna je vremenu razvoja (jedinica: 1/dan) i predstavlja dio razvoja ličinki koji se odvija tijekom jednog dana. Brzina razvoja preferira se za evaluaciju ovih studija o toksičnosti sedimenta jer je njezina varijanca niža, a homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u usporedbi s vremenom razvoja. Stoga se mogu koristiti moćni postupci parametarskih testova s brzinom razvoja radije nego s vremenom razvoja. Za brzinu razvoja kao kontinuirani odgovor mogu se procijeniti vrijednosti EC_x regresijskom analizom (npr. (23), (24)).

51. Za sljedeće statističke testove pretpostavlja se da se broj mušica zamijećen na dan pregleda x preobrazio u srednjem vremenskom intervalu između dana x i dana x - l (l = trajanje intervala pregleda, obično 1 dan). Srednja brzina razvoja po posudi ($\bar{x}$) računa se prema:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

gdje je:

$\bar{x}$: srednja brzina razvoja po posudi

i: indeks intervala pregleda

m: maksimalni broj intervala pregleda

f_i: broj mušica preobraženih u intervalu pregleda i

n_e: ukupni broj mušica preobraženih na kraju pokusa ($= \sum f_i$)

x_i: brzina razvoja mušica preobraženih u intervalu i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

gdje je:

day_i: dan pregleda (dani od primjene)

l_i: trajanje intervala pregleda i (dani, obično 1 dan)

Izvješće o ispitivanju

52. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće podatke:

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i, gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (topljivost u vodi, tlak pare, podjelni koeficijent u tlu (ili u sedimentu ako postoji), stabilnost u vodi itd.);

— podaci za identifikaciju kemikalije (opći naziv, kemijski naziv, CAS broj itd.), uključujući i čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane tvari.

Ispitne vrste:

— korištene ispitne životinje: vrsta, znanstveni naziv, izvor organizama i uvjeti uzgoja;

— podaci o rukovanju masama jajašaca i ličinkama;

— starost ispitnih životinja u trenutku umetanja u ispitne posude.

Uvjeti ispitivanja:

— korišteni sediment, tj. prirodni ili formulirani sediment;

— za prirodni sediment lokacija i opis mjesta uzorkovanja sedimenta, uključujući, po mogućnosti, povijest onečišćenja, svojstva: pH, sadržaj organskog ugljika, omjer C/N i granulometrija (ako je prikladno);

— priprema formuliranog sedimenta: sastojci i svojstva (sadržaj organskog ugljika, pH, vlaga itd. na početku ispitivanja);

— priprema ispitne vode (ako se koristi obrađena voda) i svojstva (koncentracija kisika, pH, provodljivost, tvrdoća itd. na početku ispitivanja);

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta;

— volumen vode iznad sedimenta i porne vode, masa mokrog sedimenta sa i bez porne vode;

▼M4

— ispitne posude (materijal i veličina);

— metoda obrađivanja sedimenta spikingom: korištene ispitne koncentracije, broj višestrukih određivanja i uporaba otapala, ako je isti korišten;

— faza stabilizacijskog uravnoteženja sustava sediment/voda obrađenog spikingom: trajanje i uvjeti;

— uvjeti inkubacije: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti, dozračivanje (učestalost i intenzitet);

— detaljni podaci o hranjenju, uključujući i vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

Rezultati:

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane tvari u ispitnoj posudi;

— kakvoća vode u ispitnim posudama, tj. pH, temperatura, otopljeni kisik, tvrdoća i amonijak;

— nadolijevanje isparene ispitne vode, ako je bilo;

— broj preobraženih muških i ženskih mušica po posudi i po danu;

— broj ličinki koje se nisu preobrazile u mušice po posudi;

— srednja pojedinačna suha masa ličinki po posudi i po stadiju razvoja, ako je to primjereno;

— postotak preobrazbe po određivanju i ispitnoj koncentraciji (muške i ženske mušice zajedno);

— srednja brzina razvoja potpuno preobraženih mušica po određivanju i brzina tretmana (muške i ženske mušice zajedno);

— procjena toksičnih konačnih učinaka, npr. ECx (i s time povezani intervali pouzdanosti), NOEC i/ili LOEC, te statističke metode korištene za njihovo određivanje;

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na rezultate ispitivanja nastao uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10. Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

11. Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Ispitna metoda C.8 ovog Priloga, Toksičnost za gujavice.

15. Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

16. Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

17. Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

18. Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

19. Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

20. Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

21. Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

22. Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

23. Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

24. Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Za potrebe ove ispitne metode koriste se sljedeće definicije:

Formulirani sediment ili obrađeni, umjetni ili sintetički sediment je smjesa tvari koja se koristi za oponašanje fizikalnih sastojaka prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta je voda koja se ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Međuprostorna voda ili porna voda je voda u prostoru između sedimenta i čestica tla.

Sediment obrađen spikingom je sediment u koji je dodana ispitivana tvar.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M4

Dodatak 2.

Preporuke za uzgoj kulture *Chironomus riparius*

1. Ličinke vrste *Chironomus* mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim spremnicima. Fini kremeni pijesak nanese se u tankom sloju dubine oko 5 do 10 mm po dnu spremnika. Također se pokazalo da je dijatomejska zemlja (npr. Merck, Art 8117) prikladan supstrat (dostatan je tanji sloj od svega par mm). Potom se dodaje prikladna voda u dubini od nekoliko cm. Trebalo bi nadolijevati vodu po potrebi kako bi se zamijenila voda izgubljena isparavanjem i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može nadolijevati. Treba osigurati blago dozračivanje. Posude za uzgoj ličinki trebale bi se držati u prikladnom kavezu koji će spriječiti bijeg preobraženih odraslih životinja. Kavez treba biti dovoljno velik da se preobražene odrasle životinje mogu rojiti, u protivnom možda neće doći do kopulacije (minimalno oko 30 × 30 × 30 cm).

2. Kaveze treba držati na sobnoj temperaturi ili u prostoriji s konstantnim okolišem na 20 ± 2 °C s fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1 000 luksa), 8 sati mraka. Iz raznih izvješća saznajemo da vlažnost zraka ispod 60 % RV može spriječiti razmnožavanje.

Voda za razrjeđivanje

3. Može se koristiti bilo koja prikladna prirodna ili sintetička voda. Obično se koriste izvorska voda, deklorirana voda iz slavine i umjetni mediji (npr. mediji Elendt „M4” ili „M7”, vidjeti u nastavu teksta). Voda se prije uporabe mora dozračiti. Ako je to potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlijevanjem korištene vode iz posuda za uzgoj kulture, izravno ili putem sifona, da se pritom ne unište cjevčice s ličinkama.

Hranjenje ličinki

4. Ličinke vrste *Chironomus* treba hraniti pahuljicama riblje hrane (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična robna marka riblje hrane), i to otprilike 250 mg dnevno po posudi. Hrana se može dati i kao suhi usitnjeni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljaste hrane doda se u 20 ml vode za razrjeđivanje i izmiješa u homogenu smjesu. Taj se pripravak može dodavati brzinom od oko 5 ml dnevno po posudi (protresti prije uporabe). Starije ličinke mogu dobiti više hrane.

5. Hranjenje se prilagođava kakvoći vode. Ako hranjiva podloga za uzgoj kultura postane „mutna”, treba smanjiti hranjenje. Dodavanje hrane mora se pažljivo nadzirati. Premalo hrane dovest će do prebacivanja ličinki prema vodenom stupcu, a previše hrane dovest će do povećane aktivnosti mikroba i sniženih koncentracija kisika. Oba ta uvjeta mogu dovesti do sniženih brzina rasta.

6. Također se mogu dodati i stanice nekih zelenih algi (npr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kada se postavljaju nove posude za uzgoj kultura.

Hranjenje preobraženih odraslih životinja

7. Neki izvođači pokusa sugerirali su da bi vuneni podložak namočen u zasićenoj šećernoj otopini mogao poslužiti kao hrana za preobražene odrasle životinje.

▼M4

Preobrazba

8. Na 20 ± 2 °C ličinke se počinju preobražavati u odrasle životinje iz posuda za uzgoj ličinki nakon otprilike 13 - 15 dana. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima.

Mase jajašaca

9. Kad se u kavezu za uzgoj pojave odrasle životinje, u svim posudama za uzgoj ličinki triput tjedno treba provjeravati ima li položenih želatinoznih masa jajašaca. Ako ima masa jajašaca, njih treba pažljivo ukloniti. Treba ih prenijeti u malu posudu u kojoj se nalazi uzorak vode za uzgoj. Te se mase jajašaca koriste za postavljanje nove posude za uzgoj kulture (npr. 2 - 4 mase jajašaca/posudi) ili se koriste za testove toksičnosti.

10. Valjenje ličinki u prvom stadiju razvoja trebalo bi se zbiti nakon 2 - 3 dana.

Postavljanje novih posuda za uzgoj kulture

11. Kad se kulture razviju, trebalo bi biti moguće postaviti novu posudu za uzgoj kulture jedanput tjedno ili rjeđe, ovisno o potrebama ispitivanja, i ukloniti starije posude nakon što se ličinke preobraze u odrasle mušice. Na taj će se način uz minimalno upravljanje stvarati redovita zaliha odraslih životinja.

Priprema ispitnih otopina „M4” i „M7”

12. Elendt (1990.) je opisao medij „M4”. Medij „M7” priprema se kao medij „M4”, osim za tvari iz tablice 1., za koje su koncentracije četiri puta niže u „M7” od onih u „M4”. Publikacija o mediju „M7” trenutačno se priprema (Elendt, osobna prepiska). Ispitnu otopinu ne treba pripremati prema Elendtu i Biasu (1990.) jer koncentracije NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 i K2HPO4 navedene za pripremu radnih otopina nisu adekvatne.

Priprema medija „M7”

13. Svaka se radna otopina (I) priprema zasebno, a kombinirana radna otopina (II) priprema se iz tih radnih otopina (I) (vidjeti tablicu 1.). Za pripremu medija „M7” miješa se pedeset ml kombinirane radne otopine (II) i količine svake radne otopine makronutrijenata navedene u tablici 2. do ukupno 1 litre deionizirane vode. Vitaminska radna otopina priprema se dodavanjem triju vitamina u deioniziranu vodu, kao što je naznačeno u tablici 3., a 0,1 ml kombinirane vitaminske radne otopine dodaje se konačnom mediju „M7” tik prije uporabe. (Vitaminska radna otopina čuva se zamrznuta u malim alikvotima). Medij se dozrači i stabilizira.

LITERATURA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tablica 1.

Radne otopine elemenata u tragovima za medij M4 i M7

Radne otopine (I)	Količina (mg) od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode	Za pripremu kombinirane radne otopine (II): pomiješajte sljedeće količine (mg) radnih otopina (I) u do 1 litre deionizirane vode		Konačne koncentracije u ispitnim otopinama (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ove se tvari razlikuju u M4 i M7, kao što je naznačeno gore.
(2) Ove se otopine pripremaju odvojeno, a potom se sjedine i odmah obrade u autoklavu.

Tablica 2.

Radne otopine makronutrijenata za medij M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode (mg)	Količina radnih otopina makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KC1	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tablica 3.

Vitaminska radna otopina za medij M4 i M7. Sve tri vitaminske otopine kombiniraju se u jednu vitaminsku radnu otopinu.

	Količina od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode (mg)	Količina vitaminske radne otopine koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cijanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Dodatak 3.

PRIPREMA FORMULIRANOG SEDIMENTA

Sastav sedimenta

Formulirani sediment trebao bi imati sljedeći sastav:

Sastojak	Svojstva	% sedimenta suha masa
Treset	Sphagnum moss treset, što bliže pH području od 5,5-6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) i sušen na zraku	4 - 5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu od 50-200 μm	75 - 76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljik	Prilagođava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, u prahu, kemijski čist	0,05 (- 0,1)
Voda	Provodljivost ≤ 10 μS/cm	30 (- 50)

Priprema

Treset se suši na zraku i usitnjava u fini prah. Priprema se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u deioniziranoj vodi pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti. pH te suspenzije podešava se u području od 5,5 ± 0,5 pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizirala pH i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH se ponovno mjeri i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskm glinom) i deioniziranom vodom da bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u području od 30 - 50 posto suhe mase sedimenta. Još jednom se mjeri pH konačne smjese i podešava na 6,5 do 7,5 pomoću $CaCO_3$ ako je potrebno. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i sadržaj organskog ugljika. Potom se preporučuje da se formulirani sediment, prije uporabe u testu toksičnosti trzalaca, priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u naknadnom ispitivanju.

Skladištenje

Suhi sastojci za pripremu umjetnog sedimenta mogu se skladištiti na suhom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulirani (mokri) sediment ne bi trebalo skladištiti prije uporabe u ispitivanju. Njega bi trebalo iskoristiti nakon razdoblja pripremanja od sedam dana koje završava pripremu.

LITERATURA

Poglavlje C.8 ovog Priloga. Toksičnost za gujavice.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Dodatak 4.

Kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

Tvar	Koncentracije
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

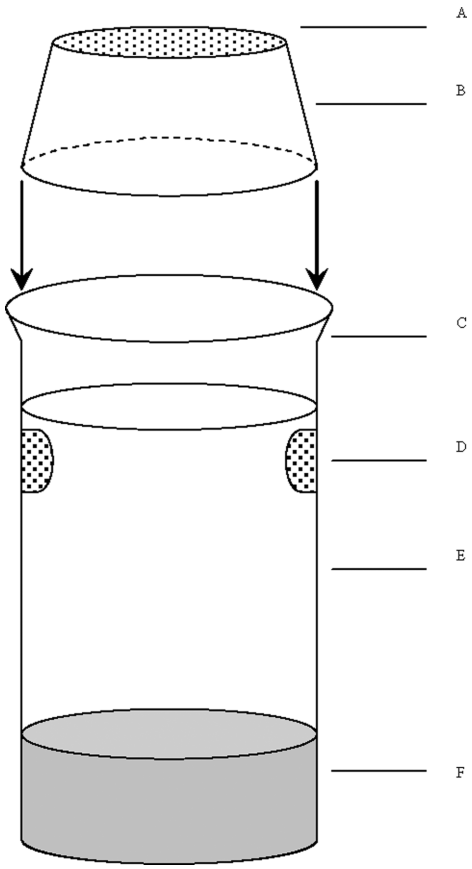
(*) Međutim, treba imati na umu da, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane tvari, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije koristiti medij Elendt M4).

▼**M4**

Dodatak 5.

Smjernice za praćenje preobrazbe ličinki trzalaca

U ispitne laboratorijske čaše postave se zamke za preobražene životinje. Te su zamke potrebne od 20. dana do kraja ispitivanja. Slijedi crtež primjera korištenih zamki:



A: najlonski zaslon

B: obrnute plastične čaše

C: laboratorijska čaša za izlaganje bez usnika

D: priključci na zaslonu za promjenu vode

E: voda

F: sediment

▼M4

C.28. TEST TOKSIČNOSTI TRZALACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA S VODOM OBRAĐENOM SPIKINGOM

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara OECD TG 219 (2004.). Ova je ispitna metoda namijenjena procjeni učinaka produljenog izlaganja kemikalija ličinkama slatkovodnih dvokrilaca trzalaza (*Chironomus* sp) koje borave u sedimentu. Uglavnom se temelji na smjernici BBA u kojoj se koristi sustav ispitivanja sediment/voda s umjetnim tlom i scenarij izlaganja u vodenom stupcu (1). Ona također uzima u obzir i postojeće protokole testova toksičnosti za *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans* koji su razvijeni u Europi i Sjevernoj Americi (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) i ispitani u prstenastom testu (1)(6)(9). Mogu se koristiti i druge vrste trzalaca o kojima postoji dobra dokumentacija, npr. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Scenarij izlaganja koji se koristi u ovoj ispitnoj metodi jest obrađivanje vode spikingom. Odabir prikladnog scenarija izlaganja ovisi o cilju provođenja testa. Cilj scenarija izlaganja u vodi, uključujući i obrade vodenog stupca spikingom, jest simulirati rasap pesticida, a obuhvaća i početne vršne koncentracije u pornoj vodi. Koristan je i za druge vrste izlaganja (uključujući i izlijevanja kemikalija), osim procesa akumulacije koji traju dulje od razdoblja ispitivanja.

3. Tvari koje treba ispitati na organizme koji žive u sedimentu obično u njemu opstaju tijekom duljih razdoblja. Organizmi iz sedimenta mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno da bi svaki od tih načina pridonio općim učincima toksičnosti ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima predmetne kemikalije. Za jako adsorptivne tvari (npr. s log K_{ow} > 5) ili za tvari koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama značajan način izlaganja može biti gutanje kontaminirane hrane. Kako se ne bi podcijenila toksičnost jako lipofilnih tvari, može se u obzir uzeti uporaba hrane koja se dodaje sedimentu prije primjene ispitivane tvari. Da bi se u obzir uzeli svi potencijalni načini izlaganja, ova se ispitna metoda usredotočuje na dugotrajno izlaganje. Test traje u rasponu od 20 - 28 dana za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a 28 - 65 dana za *C. tentans*. Ako su za neku specifičnu svrhu potrebni kratkotrajni podaci, primjerice radi istraživanja učinaka nestabilnih kemikalija, višestruka određivanja mogu se ukinuti nakon deset dana.

4. Izmjereni konačni učinci jesu ukupni broj odraslih životinja preobraženih u vrijeme preobrazbe. Preporučuje se da se preživljavanje i rast ličinki mjere tek nakon deset dana ako su potrebni dodatni kratkotrajni podaci, i to pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to prikladno.

5. Preporučuje se uporaba formuliranog sedimenta. Formulirani sediment ima nekoliko prednosti nad prirodnim sedimentima:

— pokusna varijabilnost je smanjena jer stvara mjerno obnovljivu „standardiziranu matricu” te se eliminira potreba za pronalaženjem nekontaminiranih i čistih izvora sedimenta;

— testovi se mogu provoditi u bilo koje doba, a da se pritom ne suočava sa sezonskom varijabilnošću u ispitnom sedimentu, a nema ni potrebe za prethodnom obradom sedimenta radi uklanjanja urođene faune; uporaba formuliranog sedimenta također snižava troškove povezane s terenskim prikupljanjem dovoljnih količina sedimenta za rutinsko testiranje;

▼M4

— uporaba formuliranog sedimenta omogućuje usporedbu toksičnosti i razvrstavanje tvari u skladu s tim: podaci o toksičnosti iz testova s prirodnim i umjetnim sedimentom mogli su se usporediti za nekoliko kemikalija (2).

6. Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ličinke trzalaca u prvom stadiju razvoja izlažu se rasponu koncentracija ispitivane tvari u sustavima sediment/voda. Ispitivanje počinje stavljanjem ličinki u prvom stadiju razvoja u ispitne laboratorijske čaše u kojima se nalazi sustav sediment/voda i naknadnom obradom ispitivane tvari u vodi spikingom. Na kraju testa mjeri se brzina preobrazbe i razvoja trzalaca. Također se mogu mjeriti i preživljavanje i masa ličinki nakon deset dana, ako je to potrebno (pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to primjereno). Ti se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize s ciljem određivanja koncentracije koja bi izazvala × % smanjenje u preobrazbi, preživljavanju ili rastu ličinki (npr. EC_{15}, EC_{50} itd.) bilo statističkim hipotetskim testiranjem s ciljem određivanja NOEC-a/LOEC-a. Za potonje je potrebna usporedba vrijednosti učinka s kontrolnim vrijednostima pomoću statističkih testova.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

8. Trebali bi biti poznati topljivost ispitivane tvari u vodi, njezin tlak pare, izmjerena ili izračunata razdioba u sedimentu i stabilnost u vodi i sedimentu. Treba biti dostupna pouzdana analitička metoda kvantifikacije ispitivane tvari u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i sedimentu, zajedno s poznatom i prijavljenom preciznošću i granicama detekcije. Korisne informacije obuhvaćaju strukturnu formulu i čistoću ispitivane tvari. Korisna informacija je još i kemijska sudbina ispitivane tvari (npr. rasipanje, abiotička i biotička razgradnja itd.). Daljnje smjernice za testiranje tvari čija su fizikalno-kemijska svojstva takva da je zbog njih teško provoditi testove nalaze se u (12).

REFERENTNE KEMIKALIJE

9. Referentne kemikalije mogu se ispitivati periodično kako bi se osigurala pouzdanost protokola i uvjeta ispitivanja. Primjeri referentnih toksičnih tvari koji se uspješno koriste u prstenastim testovima i validacijskim studijama jesu: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid i kalijev klorid. (1)(2)(5)(6)(13).

VALJANOST ISPITIVANJA

10. Da bi test bio valjan, primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— postotak preobrazbe u kontrolnim posudama mora na kraju testa iznositi najmanje 70 %. (1)(6);

— preobrazba vrsti *C. riparius* i *C. yoshimatsui* u odrasle životinje u kontrolnim posudama treba se odviti između 12. i 23. dana nakon njihova umetanja u posude; za vrstu *C. tentans* potrebno je razdoblje od 20 do 65 dana.

— na kraju testa treba u svakoj posudi izmjeriti pH i koncentraciju otopljenog kisika. Koncentracija kisika treba iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV) na određenoj temperaturi, a pH vode iznad sedimenta treba biti u rasponu od 6-9 u svim ispitnim posudama;

▼M4

— temperatura vode ne bi se smjela razlikovati za više od ± 1,0 °C. Temperatura vode može se kontrolirati izotermičkom sobom i u tom slučaju temperatura u prostoriji treba se potvrđivati u odgovarajućim vremenskim razmacima.

OPIS METODE

Ispitne posude

11. Studija se provodi u staklenim laboratorijskim čašama od 600 ml promjera 8 cm. Prikladne su i druge posude, ali se mora zajamčiti da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. Površina sedimenta mora biti dovoljno velika da po svakoj ličinki bude 2 do 3 cm^2 površine. Omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba biti 1:4. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u doticaj sa sustavom ispitivanja treba biti načinjena u cijelosti od stakla ili nekog drugog kemijski inertnog materijala (npr. teflona).

Odabir vrste

12. Vrsta koju treba koristiti u ovom testu po mogućnosti je *Chironomus riparius*. I vrsta *Chironomus tentans* također je prikladna, ali je njome teže rukovati te je za nju potrebno dulje vrijeme ispitivanja. Može se koristiti i vrsta *Chironomus yohimatsui*. Pojedinosti o metodi uzgoja kulture nalaze se u Dodatku 2. za vrstu *Chironomus riparius*. Podaci o uvjetima uzgoja kulture dostupni su također i za druge vrste, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yoshimatsui* (11). Mora se potvrditi identifikacija vrste prije ispitivanja, ali to nije potrebno prije svakog ispitivanja ako organizmi potječu iz kulture uzgojene u laboratoriju.

Sediment

13. Po mogućnosti bi se trebao koristiti formulirani sediment (zvan još i obrađeni, umjetni ili sintetički sediment). Međutim, ako se koristi prirodni sediment, isti se treba karakterizirati (barem pH, sadržaj otopljenog ugljika, a preporučuje se i određivanje drugih parametara kao što su omjer C/N i granulometrija) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli natjecati sa ili jesti trzalce. Također se preporučuje da se prirodni sediment, prije uporabe u testu toksičnosti trzalaca, prethodno priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Za uporabu u ovom ispitivanju preporučuje se sljedeći formulirani sediment, na temelju umjetnog tla iz ispitne metode C.8 (14), (1)(15)(16):

(a) 4-5 % (suhe mase) treseta: što je moguće bliže pH od 5,5 do 6,0; važno je da se koristi treset u obliku praha, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 1 mm) i isključivo sušen na zraku.

(b) 20 % (suhe mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %).

(c) 75-76 % (suhe mase) kremenog pijeska (fini bi pijesak trebao prevladavati s više od 50 % čestica između 50 i 200 μm).

(d) Dodaje se deionizirana voda kako bi se dobila vlaga konačne smjese u rasponu od 30 - 50 %.

(e) Dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kakvoće ($CaCO_3$) kako bi se pH konačne smjese sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5.

(f) Sadržaj organskog ugljika konačne smjese trebao bi iznositi 2 % (± 0,5 %) i treba se prilagoditi dodavanjem odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c).

▼M4

14. Treba biti poznat izvor treseta, kaolinitske gline i pijeska. Treba provjeriti nisu li komponente sedimenta kemijski kontaminirane (npr. teški metali, organoklorni spojevi, organofosforni spojevi itd.). Primjer pripreme formuliranog sedimenta opisan je u Dodatku 3. I miješanje suhih sastojaka također je prihvatljivo ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. lebdenje čestica treseta) i da su treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljeni.

Voda

15. Kao ispitna voda prikladna je svaka voda koja ima kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje koja su navedena u dodacima 2. i 4. Kao voda za uzgoj kultura i ispitna voda prikladna je svaka prikladna voda, prirodna voda (površinske ili podzemne vode), obrađena voda (vidjeti Dodatak 2.) ili deklorirana voda iz slavine ako će trzalci u njoj preživjeti tijekom uzgoja kulture i ispitivanja, a da ne pokažu nikakve znakove stresa. Na početku testa pH ispitne vode treba biti između 6 i 9, a ukupna tvrdoća ne viša od 400 mg/l kao $CaCO_3$. Međutim, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane tvari, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije koristiti medij Elendt M4). Tijekom cijele studije trebalo bi koristiti istu vrstu vode. Najmanje dvaput godišnje ili kada se sumnja da su se svojstva kakvoće vode navedena u Dodatku 4. značajno promijenila, treba izmjeriti ta svojstva.

Radne otopine - voda obrađena spikingom

16. Ispitne koncentracije izračunavaju se na temelju koncentracija u vodenom stupcu, tj. u vodi iznad sedimenta. Ispitne otopine u odabranoj koncentraciji pripremaju se razrjeđivanjem radne otopine. Radne otopine trebalo bi, po mogućnosti, pripremiti otapanjem ispitivane tvari u ispitnom mediju. Možda će u nekim slučajevima biti potrebno upotrijebiti otapala ili dispergente kako bi se dobila prikladno koncentrirana radna otopina. Primjeri prikladnih otapala jesu: aceton, etanol, metanol, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamid i trietilen glikol. Dispergenti koji se mogu koristiti jesu Cremophor RH40, Tween 80, metil-celuloza 0,01 % i HCO-40. Koncentracija otapajućeg sredstva u konačnom ispitnom mediju trebala bi biti minimalna (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) i trebala bi biti ista u svim tretmanima. Kada se koristi otapajuće sredstvo, ono ne smije imati nikakve značajne učinke na preživljavanje ili nikakav vidljiv negativan učinak na ličinke trzalaca, što se otkriva kontrolom samo s otapalom. Međutim, treba uložiti sve napore da se izbjegne uporaba takvih tvari.

PLAN ISPITIVANJA

17. Plan ispitivanja odnosi se na odabir broja i raspored ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju i na broj ličinki po posudi. Opisani su planovi za procjenu točke koncentracije s učinkom (EC), za procjenu najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) i za provođenje graničnog ispitivanja. Regresijskoj se analizi daje prednost nad pristupom testiranja hipoteze.

Plan za regresijsku analizu

18. Koncentracija s učinkom (npr. EC_{15}, EC_{50}) i raspon koncentracije, iznad kojega je učinak ispitivane tvari od interesa, trebaju obuhvaćati koncentracije uključene u ispitivanje. Općenito, preciznost, a posebno valjanost, s kojom se mogu procijeniti koncentracije s učinkom (EC_x), poboljšavaju se kad se koncentracija s učinkom nalazi unutar raspona ispitnih koncentracija. Treba

▼M4

izbjegavati ekstrapolaciju ispod najniže pozitivne koncentracije ili iznad najviše koncentracije. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona korisno je za odabir raspona koncentracija koji će se koristiti (vidjeti stavak 27.).

19. Ako treba procijeniti EC_x, treba ispitati najmanje pet koncentracija i tri višestruka određivanja. U svakom se slučaju savjetuje korištenje dovoljnog broja ispitnih koncentracija kako bi se dobila dobra procjena modela. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (iznimka se može učiniti u slučajevima kada krivulja odgovora na dozu ima plitak nagib). Broj višestrukih određivanja u svakom tretmanu može se sniziti ako se poveća broj ispitnih koncentracija različitog odgovora. Povećanjem broja višestrukih određivanja ili smanjivanje trajanja intervala ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti. Dodatna višestruka određivanja potrebna su ako treba procijeniti 10 - dnevno preživljavanje i rast ličinki.

Plan za procjenu NOEC-a/LOEC-a

20. Ako treba procijeniti LOEC/NOEC (najnižu koncentraciju s vidljivim učinkom/najvišu koncentraciju bez vidljivog učinka), treba koristiti pet ispitnih koncentracija u najmanje četiri višestruka određivanja, a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva. Broj višestrukih određivanja trebao bi biti dovoljan da osigura adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri razini značajnosti od 5 % ($p = 0,05$). Kod brzine razvoja obično je prikladna analiza varijance (ANOVA), kao što su Dunnettov test i Williamsov test (17)(18)(19)(20). Kod omjera preobrazbe mogu se koristiti Cochran-Armitageov test, Fisherov test (s Bonferronijevom korekcijom) ili Mantel-Haenszelov test.

Granično ispitivanje

21. Može se provesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrolna posuda) ako se u preliminarnom testu za određivanje raspona ne vide nikakvi učinci. Cilj graničnog ispitivanja jest naznačiti da je vrijednost toksičnosti ispitivane tvari veća od ispitivane granične koncentracije. U ovoj se ispitnoj metodi ne mogu dati nikakvi prijedlozi preporučene koncentracije; to se prepušta prosudbi zakonodavca. Obično je potrebno najmanje šest višestrukih određivanja i za ispitnu i za kontrolnu posudu. Treba pokazati adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri razini značajnosti od 5 % ($p = 0,05$). Kod metričkog odgovora (brzina razvoja i masa) t-test je prikladna statistička metoda ako podaci zadovoljavaju zahtjeve tog testa (normalnost, homogene varijance). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, mogu se koristiti t-test nejednake varijance ili neparametarski test, kao što je Wilcoxon-Mann-Whitheyev test. Kod omjera preobrazbe prikladan je Fisherov test.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Priprema sustava voda/sediment obrađenog spikingom

22. Odgovarajuće količine formuliranog sedimenta (vidjeti stavke 13.-14. i Dodatak 3.) dodaju se u ispitne posude gdje tvore sloj debljine najmanje 1,5 cm. Voda se nadolijeva do 6 cm (vidjeti stavak 15.). Omjer debljine sloja sa sedimentom i dubine vode ne bi smio premašivati 1:4, a sloj sa sedimentom ne bi trebao biti deblji od 3 cm. Sustav sediment/voda treba blago dozračivati sedam dana prije dodavanja ispitnih organizama (vidjeti stavak 14. i Dodatak 3.). Da bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendiranje finog materijala tijekom dodavanja ispitne vode u vodeni stupac, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega lijeva voda, a disk se miče odmah nakon toga. Mogu biti prikladni i drugi predmeti.

▼M4

23. Ispitne posude bi trebale biti pokrivene (npr. staklenim pločama). Ako je potrebno, tijekom studije se u izvorni volumen vode nadolijeva još vode kako bi se nadomjestilo isparavanje vode. To bi se trebalo činiti pomoću destilirane ili deionizirane vode kako bi se spriječilo stvaranje soli.

Dodavanje ispitnih organizama

24. Četiri do pet dana prije dodavanja ispitnih organizama u ispitne posude, mase jajašaca bi se trebale izvaditi iz kultura i staviti u male posude u hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Mogu se koristiti stara hranjiva podloga iz matične kulture ili svježe pripremljena hranjiva podloga za uzgoj kulture. Ako se koristi potonja, hranjivoj podlozi za uzgoj kulture treba dodati manju količinu hrane, npr. zelenih algi i/ili nekoliko kapljica suspenzije fino mljevenih pahuljica riblje hrane (vidjeti Dodatak 2.). Treba koristiti samo svježe položene mase jajašaca. Valjenje ličinki obično počinje nekoliko dana nakon polaganja jajašaca (2 do 3 dana za *Chironomus riparius* na 20 °C i 1 do 4 dana za *Chironomus tentans* na 23 °C i za *Chironomus yoshimatui* na 25 °C), a ličinke se razvijaju u četiri stadija razvoja, od kojih svaki traje 4-8 dana. U ispitivanju treba koristiti ličinke iz prvog stadija razvoja (2-3 ili 1-4 dana poslije valjenja). Stadij mušica moguće je provjeriti pomoću širine kapsule glave (6).

25. Dvadeset ličinki iz prvog stadija razvoja stavljaju se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava vodu i sediment obrađen spikingom, i to pomoću tupe pipete. Treba zaustaviti dozračivanje vode tijekom dodavanja ličinki u ispitne posude i tako treba ostati još 24 sata nakon dodavanja ličinki (vidjeti stavke 24. i 32.). Prema upotrijebljenom planu ispitivanja (vidjeti stavke 19. i 20.) broj ličinki po koncentraciji iznosi najmanje 60 za procjenu točke EC-a i 80 za određivanje NOEC-a.

26. Dvadeset i četiri sata nakon dodavanja ličinki ispitivana tvar dodaje se spikingom u vodeni stupac iznad sedimenta i ponovno se osigura blago dozračivanje. Male količine otopina ispitivane tvari stavljaju se ispod površine vode pipetom. Voda iznad sedimenta trebala bi se potom pažljivo promiješati kako se sediment ne bi umiješao.

Ispitne koncentracije

27. Ispitivanje za određivanje raspona može biti korisno za određivanje raspona koncentracija za konačno ispitivanje. U tu se svrhu koristi niz široko razmaknutih koncentracija ispitivane tvari. Da bi se dobila ista gustoća površine po trzalcu, koja će se koristiti i u konačnom ispitivanju, trzalci se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane tvari tijekom vremena koje omogućuje procjenu odgovarajućih ispitnih koncentracija, a nisu potrebna višestruka određivanja.

28. O ispitnim koncentracijama za konačno ispitivanje odlučuje se na temelju rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Trebalo bi koristiti i odabrati najmanje pet koncentracija, kao što je to opisano u stavcima 18. do 20.

Kontrolne posude

29. U ispitivanje bi, s odgovarajućim brojem višestrukih određivanja, trebalo uključiti kontrolne posude bez ispitivane tvari, ali sa sedimentom (vidjeti stavke 19.-20.). Ako se za primjenu ispitivane tvari koristilo otapalo (vidjeti stavak 16.), treba dodati i kontrolnu posudu s otapalom sedimenta.

▼M4

Sustav ispitivanja

30. Koriste se statički sustavi. Polustatični ili protočni sustavi sa stalnim ili isprekidanim obnavljanjem vode iznad sedimenta mogu se koristiti u iznimnim slučajevima, na primjer ako specifikacije kakvoće vode postanu neprikladne za ispitni organizam ili ako utječu na uravnoteženje kemikalije (npr. ako razine otopljenog kisika previše padnu, ako se previše povisi koncentracija proizvoda izlučivanja ili ako iz sedimenta cure minerali koji utječu na pH i/ili tvrdoću vode). Međutim, obično su dostatne i daje se prednost drugim metodama poboljšanja kakvoće vode iznad sedimenta, kao što je dozračivanje.

Hrana

31. Potrebno je hraniti ličinke, po mogućnosti svakodnevno ili najmanje triput tjedno. Čini se da je riblja hrana (suspenzija u vodi fino mljevene hrane, npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll; pojedinosti vidjeti u Dodatku 2.) u količini od 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg za *C. yoshimatui*) dnevno po ličinki prikladna za mlade ličinke prvih 10 dana. Za starije će ličinke biti potrebno malo više hrane: 0,5 - 1 mg dnevno po ličinki trebalo bi biti dostatno za ostatak ispitivanja. Porcije hrane treba smanjiti u svim tretmanima te kontrolirati rastu li gljivice i primijeti li se smrtnost u kontrolnim posudama. Ako se ne može zaustaviti rast gljivica, ispitivanje treba ponoviti. Kada se ispituju jako adsorptive tvari (npr. čiji je log K_{ow} > 5) ili tvari koje stvaraju kovalentne veze sa sedimentom, formuliranom se sedimentu prije faze stabilizacije može dodati količina hrane neophodna za osiguranje preživljavanja i prirodnog rasta organizama. U tu se svrhu, umjesto riblje hrane, mora koristiti biljni materijal, npr. može se dodati 0,5 % (suha masa) fino usitnjenog lišća npr. velike koprive (*Urtica dioica*), duda (*Morus alba*), bijele djeteline (*Trifolium repens*), špinata (*Spinacia oleracea*) ili nekog drugog biljnog materijala (*Cerophyl* ili alfa-celuloze).

Uvjeti za inkubaciju

32. Blago dozračivanje vode iznad sedimenta u ispitnim posudama osigurava se po mogućnosti 24 sata poslije dodavanja ličinki i traje tako tijekom cijelog ispitivanja (treba se pobrinuti da koncentracija otopljenog kisika ne padne ispod 60 % ASV-a). Dozračivanje se vrši putem staklene pasterove pipete pričvršćene 2-3 cm iznad sloja sedimenta (tj. jedan ili par mjehurića/s). Pri ispitivanju hlapljivih kemikalija može se pobrinuti da se ne dozračuje sustav sediment/voda.

33. Ispitivanje se provodi na konstantnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za *C. tentans* i *C. yoshimatui* preporučene temperature su 23 °C odnosno 25 °C (± 2 °C). Koristi se fotoperiod od 16 sati, a jačina svjetlosti treba biti 500 do 1 000 luksa.

Trajanje izlaganja

34. Izlaganje počinje dodavanjem ličinki u posude sa sedimentom obrađenim spikingom i kontrolne posude. Maksimalno trajanje izlaganja je 28 dana za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a 65 dana za *C. tentans*. Ako se ličinke prije preobraze u mušice, ispitivanje se može prekinuti nakon minimalno pet dana nakon što se i zadnja ličinka u kontrolnoj posudi preobrazi u odraslu životinju.

PROMATRANJA

Preobrazba

35. Određuju se vrijeme razvoja i ukupni broj muških i ženskih mušica koje su se u cijelosti preobrazile. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima.

▼M4

36. Ispitne posude treba promatrati najmanje triput tjedno da bi se vizualno procijenilo svako nenormalno ponašanje (npr. napuštanje sedimenta, neuobičajeno plivanje) u usporedbi s kontrolnim posudama. Tijekom razdoblja očekivane preobrazbe potrebno je svakodnevno brojati preobražene mušice. Svakodnevno se vodi evidencija i o spolu i broju preobraženih mušica. Nakon identifikacije mušice se vade iz posuda. Treba zabilježiti sve mase jajašaca položene prije prekida ispitivanja te ih treba izvaditi kako bi se spriječilo ponovno uvođenje ličinki u sediment. Također se bilježi i broj vidljivih kukuljica koje se nisu uspjele preobraziti. Smjernice o mjerenju preobrazbe navedene su u Dodatku 5.

Rast i preživljavanje

37. Ako treba dobiti podatke o 10-dnevnom preživljavanju i rastu ličinki, na samom početku treba dodatne ispitne posude kako bi ih se moglo naknadno koristiti. Sediment iz tih dodatnih posuda prosijava se kroz sito od 250 μm kako bi se zadržale ličinke. Kriteriji za smrt jesu nepomičnost ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje. I neoporavljene ličinke treba prebrojati kao mrtve (možda su mikrobi već razgradili ličinke koje su uginule na početku ispitivanja). Određuje se suha masa (bez pepela) preživjelih ličinki po svakoj ispitnoj posudi pa se izračunava srednja pojedinačna suha masa po posudi. Korisno je odrediti kojem stadiju razvoja pripadaju preživjele ličinke; za to se može upotrijebiti mjerenje širine kapsule glave svake ličinke.

Analitička mjerenja

Koncentracija ispitivane tvari

38. Kao minimum, na početku (po mogućnosti sat vremena poslije dodavanja ispitivane tvari) i na kraju ispitivanja moraju se analizirati uzorci vode iznad sedimenta, porne vode i sedimenta, i to u najvišoj koncentraciji i u nekoj nižoj. Ta određivanja koncentracije ispitivane tvari daju informacije o ponašanju/razdiobi ispitivane tvari u sustavu voda/sediment. Uzorkovanje sedimenta na početku ispitivanja može utjecati na sustav ispitivanja (npr. uklanjanje ispitnih ličinki) pa bi stoga trebalo koristiti dodatne ispitne posude za provođenje analitičkih određivanja na početku i tijekom ispitivanja, po potrebi (vidjeti stavak 39.). Možda neće biti potrebno provoditi mjerenja u sedimentu ako je razdioba ispitivane tvari i između vode i sedimenta jasno određena u studiji vode/sedimenta u poredbenim uvjetima (npr. omjer sedimenta i vode, vrsta primjene, sadržaj organskog ugljika u sedimentu).

39. Kada se provode posredna mjerenja (npr. 7. dana) te ako su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda, a da to pritom ne utječe na sustav ispitivanja, analitička određivanja treba provoditi na uzorcima iz dodatnih ispiinih posuda koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisustvo ispitnih organizama), ali koje se ne koriste za biološka promatranja.

40. Preporučeni postupak za izoliranje međuprostorne vode jest centrifugiranje na npr. 10 000 g i 4 °C tijekom 30 min. Međutim, ako se pokaže da se ispitivana tvar ne adsorbira na filtre, prihvatljiva bi mogla biti i filtracija. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi jer je uzorak premalen.

▼M4

Fizikalno-kemijski parametri

41. Na odgovarajući način treba izmjeriti pH, otopljeni kisik u ispitnoj vodi i temperaturu u ispitnim posudama (vidjeti stavak 10.). Tvrdoću i amonijak treba mjeriti u kontrolnim posudama i u jednoj ispitnoj posudi u najvišoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

42. Cilj ovog ispitivanja jest odrediti učinak ispitivane tvari na brzinu razvoja i ukupni broj potpuno preobraženih muških i ženskih mušica ili, u slučaju 10-dnevnog ispitivanja, učinke na preživljavanje i masu ličinki. Ako ne postoje naznake statistički različite osjetljivosti spolova, rezultati mužjaka i ženki mogu se ujediniti radi statističke analize. Razlike u osjetljivosti spolova mogu se statistički prosuditi, npr. tabličnim testom χ^2-r × 2. Preživljavanje ličinki i njihova srednja pojedinačna suha masa po posudi moraju se odrediti nakon 10 dana kada je to potrebno.

43. Koncentracije s učinkom izražene kao koncentracije u vodi iznad sedimenta izračunavaju se po mogućnosti na temelju koncentracija izmjerenih na početku ispitivanja (vidjeti stavak 38.).

44. Za izračun procjene točke EC_{50} ili bilo koje druge EC_x kao dodatna ponovna određivanja mogu se koristiti statistički podaci dobiveni za svaku posudu. U izračunu intervala pouzdanosti za bilo koji EC_x u obzir treba uzeti varijabilnost između posuda ili se treba pokazati da je ta varijabilnost toliko neznatna da se može ignorirati. Kada se model prilagođava metodi najmanjih kvadrata, na statističke podatke za svaku posudu treba primijeniti transformaciju kako bi se poboljšala homogenst varijance. Međutim, vrijednosti EC_x trebale bi se izračunati tek nakon što se odgovor transformira natrag u izvornu vrijednost.

45. Kada je cilj statističke analize određivanje NOEC-a/LOEC-a testiranjem hipoteze, u obzir se mora uzeti varijabilnost među posudama, npr. ugniježđenom ANOVA-om. Kao druga mogućnost, u situacijama kada se pobiju pretpostavke uobičajene ANOVA-e, mogu biti prikladna i robusnija ispitivanja (21).

Omjer preobrazbe

46. Omjeri preobrazbe su kvantalni podaci i mogu se analizirati Cochran-Armitageovim testom koji se primjenjuje snižavanjem korak po korak kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad se ti podaci slažu s tim očekivanjem. Ako to nije slučaj, mogu se koristiti Fisherov test ili Mantel-Haenszelov test s Bonferroni-Holmovim prilagođenim p-vrijednostima. Ako ima dokaza za još veću varijabilnost između višestrukih određivanja u istoj koncentraciji nego što bi to naznačila binomijalna raspodjela (često zvana i „ekstra-binomijalna” varijacija), treba primijeniti robusni Cochran-Armitageov ili Fisherov test kakvi su predloženi u (21).

47. Određuje se broj mušica preobraženih po posudi, n_e, koji se onda dijeli brojem uvedenih ličinki, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

gdje je:

ER = omjer preobrazbe

n_e = broj preobraženih mušica po posudi

n_a = broj uvedenih ličinki po posudi

48. Najprikladnija alternativa za velike uzorke, kada postoji ekstra-binomijalna varijanca, jest tretirati omjer preobrazbe kao kontinuirani odgovor te primijeniti postupke poput Williamovog testa kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad je isti u skladu s tim ER podacima. Dunnettov bi test bio prikladan gdje nema monotoničnosti. Veliki uzorak se ovdje definira kao broj preobraženih mušica i broj nepreobraženih mušica veći od pet, i to na osnovi ponovljenog određivanja (posude).

49. Za primjenu vrijednosti metode ANOVA vrijednosti ER-a moraju se prvo transformirati arkus sinus drugi korijen transformacijom ili Freeman-Tukeyovom transformacijom kako bi se dobila približna normalna raspodjela i ujednačile varijance. Kad se koriste apsolutne frekvencije, mogu se primijeniti Cochran-Armitageov, Fisherov (Bonferronijev) ili Mantel-Haenszelov test. Arkus sinus drugi korijen transformacija primjenjuje se tako što se uzme inverzni sinus ($\sin^{-1}$) drugog korijena ER-a.

50. Za omjere preobrazbe vrijednosti EC_x računaju se regresijskom analizom (ili npr. probit (22), logit, Weibull, prikladan komercijalni softver itd.). Ako regresijka analiza ne uspije (npr. kad imamo manje od dva djelomična odgovora), koriste se druge neparametarske metode, kao što su pomični prosjek ili jednostavna interpolacija.

Brzina razvoja

51. Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji raspon vremena između uvođenja ličinki (0. dan ispitivanja) i njihove preobrazbe u pokusnu skupinu mušica. (Za izračun stvarnog vremena razvoja u obzir treba uzeti starost ličinki u trenutku uvođenja). Brzina razvoja recipročna je vremenu razvoja (jedinica: 1/dan) i predstavlja dio razvoja ličinki koji se odvija tijekom jednog dana. Brzina razvoja preferira se za evaluaciju ovih studija o toksičnosti sedimenta jer je njezina varijanca niža, a homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u usporedbi s vremenom razvoja. Stoga se mogu koristiti moćni postupci parametarskih testova s brzinom razvoja radije nego s vremenom razvoja. Za brzinu razvoja kao kontinuirani odgovor mogu se procijeniti vrijednosti EC_x regresijskom analizom (npr. (23), (24)).

52. Za sljedeće statističke testove pretpostavlja se da se broj mušica zamijećen na dan pregleda x preobrazio u srednjem vremenskom intervalu između dana x i dana x - l (l = trajanje intervala pregleda, obično 1 dan). Srednja brzina razvoja po posudi x računa se prema:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

gdje je:

$\bar{x}$: srednja brzina razvoja po posudi

i: indeks intervala pregleda

m: maksimalni broj intervala pregleda

▼M4

f_i: broj mušica preobraženih u intervalu pregleda i

n_e: ukupni broj mušica preobraženih na kraju pokusa (= $\sum f_i$)

x_i: brzina razvoja mušica preobraženih u intervalu i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

gdje je:

day_i: dan pregleda (dani od primjene)

l_i: trajanje intervala pregleda i (dani, obično 1 dan)

Izvješće o ispitivanju

53. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće podatke:

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i, gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (topljivost u vodi, tlak pare, podjelni koeficijent u tlu (ili u sedimentu ako postoji), stabilnost u vodi itd.);

— podaci za identifikaciju kemikalije (opći naziv, kemijski naziv, CAS broj itd.), uključujući i čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane tvari.

Ispitne vrste:

— korištene ispitne životinje: vrsta, znanstveni naziv, izvor organizama i uvjeti uzgoja;

— podaci o rukovanju masama jajašaca i ličinkama;

— starost ispitnih životinja u trenutku umetanja u ispitne posude.

Uvjeti ispitivanja:

— korišteni sediment, tj. prirodni ili formulirani sediment;

— za prirodni sediment lokacija i opis mjesta uzorkovanja sedimenta, uključujući, po mogućnosti, povijest onečišćenja, svojstva: pH, sadržaj organskog ugljika, omjer C/N i granulometrija (ako je prikladno).

— priprema formuliranog sedimenta: sastojci i svojstva (sadržaj organskog ugljika, pH, vlaga itd. na početku ispitivanja);

— priprema ispitne vode (ako se koristi obrađena voda) i svojstva (koncentracija kisika, pH, provodljivost, tvrdoća itd. na početku ispitivanja);

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta;

— volumen vode iznad sedimenta i porne vode, masa mokrog sedimenta sa i bez porne vode;

— ispitne posude (materijal i veličina);

— metoda pripreme radnih otopina i ispitnih koncentracija;

▼M4

— uporaba ispitivane tvari: korištene ispitne koncentracije, broj višestrukih određivanja i uporaba otapala, ako je isti korišten;

— uvjeti inkubacije: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti, dozračivanje (učestalost i intenzitet);

— detaljni podaci o hranjenju, uključujući i vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

Rezultati:

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane tvari u ispitnoj posudi;

— kakvoća vode u ispitnim posudama, tj. pH, temperatura, otopljeni kisik, tvrdoća i amonijak;

— nadolijevanje isparene ispitne vode, ako je bilo;

— broj preobraženih muških i ženskih mušica po posudi i po danu;

— broj ličinki koje se nisu preobrazile u mušice po posudi;

— srednja pojedinačna suha masa ličinki po posudi i po stadiju razvoja, ako je to primjereno;

— postotak preobrazbe po određivanju i ispitnoj koncentraciji (muške i ženske mušice zajedno);

— srednja brzina razvoja potpuno preobraženih mušica po određivanju i brzina tretmana (muške i ženske mušice zajedno);

— procjena toksičnih konačnih učinaka, npr. ECx (i s time povezani intervali pouzdanosti), NOEC i/ili LOEC, te statističke metode korištene za njihovo određivanje;

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na rezultate ispitivanja nastao uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10. Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

11. Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Poglavlje C.8 ovog Priloga, Toksičnost za gujavice,

15. Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

16. Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

17. Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

18. Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

19. Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

20. Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

21. Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

22. Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

23. Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

24. Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Za potrebe ove metode koriste se sljedeće definicije:

Formulirani sediment ili obrađeni, umjetni ili sintetički sediment je smjesa tvari koja se koristi za oponašanje fizikalnih sastojaka prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta je voda koja se u ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Međuprostorna voda ili porna voda je voda u prostoru između sedimenta i čestica tla.

Voda obrađena spikingom je voda u koju je dodana ispitivana tvar.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M4

Dodatak 2.

Preporuke za uzgoj kulture *Chironomus riparius*

1. Ličinke vrste *Chironomus* mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim spremnicima. Fini kremeni pijesak nanese se u tankom sloju dubine oko 5 do 10 mm po dnu spremnika. Također se pokazalo da je dijatomejska zemlja (npr. Merck, Art 8117) prikladan supstrat (dostatan je tanji sloj od svega par mm). Potom se dodaje prikladna voda u dubini od nekoliko cm. Trebalo bi nadolijevati vodu po potrebi kako bi se zamijenila voda izgubljena isparavanjem i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može nadolijevati. Treba osigurati blago dozračivanje. Posude za uzgoj ličinki trebale bi se držati u prikladnom kavezu koji će spriječiti bijeg preobraženih odraslih životinja. Kavez treba biti dovoljno velik da se preobražene odrasle životinje mogu rojiti, u protivnom možda neće doći do kopulacije (minimalno oko 30 x 30 x 30 cm).

2. Kaveze treba držati na sobnoj temperaturi ili u prostoriji s konstantnim okolišem na 20 ± 2 °C s fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1 000 luksa), 8 sati mraka. Iz raznih izvješća saznajemo da vlažnost zraka ispod 60 % RV može spriječiti razmnožavanje.

Voda za razrjeđivanje

3. Može se koristiti bilo koja prikladna prirodna ili sintetička voda. Obično se koriste izvorska voda, deklorirana voda iz slavine i umjetni mediji (npr. mediji Elendt ‚M4' ili ‚M7', vidjeti u nastavu teksta). Voda se prije uporabe mora dozračiti. Ako je to potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlijevanjem korištene vode iz posuda za uzgoj kulture, izravno ili putem sifona, da se pritom ne unište cjevčice s ličinkama.

Hranjenje ličinki

4. Ličinke vrste *Chironomus* treba hraniti pahuljicama riblje hrane (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična robna marka riblje hrane), i to otprilike 250 mg dnevno po posudi. Hrana se može dati i kao suhi usitnjeni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljaste hrane doda se u 20 ml vode za razrjeđivanje i izmiješa u homogenu smjesu. Taj se pripravak može dodavati brzinom od oko 5 ml dnevno po posudi (protresti prije uporabe). Starije ličinke mogu dobiti više hrane.

5. Hranjenje se prilagođava kakvoći vode. Ako hranjiva podloga za uzgoj kultura postane ‚mutna', treba smanjiti hranjenje. Dodavanje hrane mora se pažljivo nadzirati. Premalo hrane dovest će do prebacivanja ličinki prema vodenom stupcu, a previše hrane dovest će do povećane aktivnosti mikroba i sniženih koncentracija kisika. Oba ta uvjeta mogu dovesti do sniženih brzina rasta.

6. Također se mogu dodati i stanice nekih zelenih algi (npr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kada se postavljaju nove posude za uzgoj kultura.

Hranjenje preobraženih odraslih životinja

7. Neki izvođači pokusa sugerirali su da bi vuneni podložak namočen u zasićenoj šećernoj otopini mogao poslužiti kao hrana za preobražene odrasle životinje.

▼M4

Preobrazba

8. Na 20 ± 2 °C ličinke se počinju preobražavati u odrasle životinje iz posuda za uzgoj ličinki nakon otprilike 13 - 15 dana. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima.

Mase jajašaca

9. Kad se u kavezu za uzgoj pojave odrasle životinje, u svim posudama za uzgoj ličinki triput tjedno treba provjeravati ima li položenih želatinoznih masa jajašaca. Ako ima masa jajašaca, njih treba pažljivo ukloniti. Treba ih prenijeti u malu posudu u kojoj se nalazi uzorak vode za uzgoj. Te se mase jajašaca koriste za postavljanje nove posude za uzgoj kulture (npr. 2 - 4 mase jajašaca/posudi) ili se koriste za testove toksičnosti.

10. Valjenje ličinki u prvom stadiju razvoja trebalo bi se zbiti nakon 2 - 3 dana.

Postavljanje novih posuda za uzgoj kulture

11. Kad se kulture razviju, trebalo bi biti moguće postaviti novu posudu za uzgoj kulture jedanput tjedno ili rjeđe, ovisno o potrebama ispitivanja, i ukloniti starije posude nakon što se ličinke preobraze u odrasle mušice. Na taj će se način uz minimalno upravljanje stvarati redovita zaliha odraslih životinja.

Priprema ispitnih otopina ‚M4' i ‚M7'

12. Elendt (1990.) je opisao medij ‚M4'. Medij ‚M7' priprema se kao medij ‚M4', osim za tvari iz tablice 1., za koje su koncentracije četiri puta niže u ‚M7' od onih u ‚M4'. Publikacija o mediju ‚M7' trenutačno se priprema (Elendt, osobna prepiska). Ispitnu otopinu ne treba pripremati prema Elendtu i Biasu (1990.) jer koncentracije NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 i K2HPO4 navedene za pripremu radnih otopina nisu adekvatne.

Priprema medija ‚M7'

13. Svaka se radna otopina (I) priprema zasebno, a kombinirana radna otopina (II) priprema se iz tih radnih otopina (I) (vidjeti tablicu 1.). Za pripremu medija ‚M7' miješa se 50 ml kombinirane radne otopine (II) i količine svake radne otopine makronutrijenata navedene u tablici 2. do ukupno 1 l deionizirane vode. Vitaminska radna otopina priprema se dodavanjem triju vitamina u deioniziranu vodu, kao što je naznačeno u tablici 3., a 0,1 ml kombinirane vitaminske radne otopine dodaje se konačnom mediju ‚M7' tik prije uporabe. (Vitaminska radna otopina čuva se zamrznuta u malim alikvotima). Medij se dozrači i stabilizira.

Tablica 1.

Radne otopine elemenata u tragovima za medij M4 i M7

Radne otopine (I)	Količina (mg) od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode	Za pripremu kombinirane radne otopine (II): pomiješajte sljedeće količine (mg) radnih otopina (I) u do 1 litre deionizirane vode		Konačne koncentracije u ispitnim otopinama (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Radne otopine (I)	Količina (mg) od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode	Za pripremu kombinirane radne otopine (II): pomiješajte sljedeće količine (mg) radnih otopina (I) u do 1 litre deionizirane vode		Konačne koncentracije u ispitnim otopinama (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ove se tvari razlikuju u M4 i M7, kao što je naznačeno gore.
(2) Ove se otopine pripremaju odvojeno, a potom se sjedine i odmah obrade u autoklavu.

Tablica 2.

Radne otopine makronutrijenata za medij M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode (mg)	Količina radnih otopina makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KC1	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tablica 3.

Vitaminska radna otopina za medij M4 i M7

Sve tri vitaminske otopine kombiniraju se u jednu vitaminsku radnu otopinu.

	Količina od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode (mg)	Količina vitaminske radne otopine koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cijanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Dodatak 3.

PRIPREMA FORMULIRANOG SEDIMENTA

Sastav sedimenta

Formulirani sediment trebao bi imati sljedeći sastav:

Sastojak	Svojstva	% sedimenta suha masa
Treset	Sphagnum moss treset, što bliže pH području od 5,5-6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) i sušen na zraku	4-5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu od 50-200 μm	75-76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljik	Prilagođava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, u prahu, kemijski čist	0,05 (- 0,1)
Voda	Provodljivost ≤ 10 μS/cm	30 (- 50)

Priprema

Treset se suši na zraku i usitnjava u fini prah. Priprema se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u deioniziranoj vodi pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti. pH te suspenzije podešava se u području od 5,5 ± 0,5 pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizirala pH i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH se ponovno mjeri i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskm glinom) i deioniziranom vodom da bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u području od 30 - 50 posto suhe mase sedimenta. Još jednom se mjeri pH konačne smjese i podešava na 6,5 do 7,5 pomoću $CaCO_3$ ako je potrebno. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i sadržaj organskog ugljika. Potom se preporučuje da se formulirani sediment, prije uporabe u testu toksičnosti trzalaca, priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u naknadnom ispitivanju.

Skladištenje

Suhi sastojci za pripremu umjetnog sedimenta mogu se skladištiti na suhom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulirani (mokri) sediment ne bi trebalo skladištiti prije uporabe u ispitivanju. Njega bi trebalo iskoristiti nakon razdoblja pripremanja od sedam dana koje završava pripremu.

LITERATURA:

Poglavlje C.8 ovog Priloga. Toksičnost za gujavice.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Dodatak 4.

Kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

Tvar	Koncentracije
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 μg/l
Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Rezidualni klor	< 10 μg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

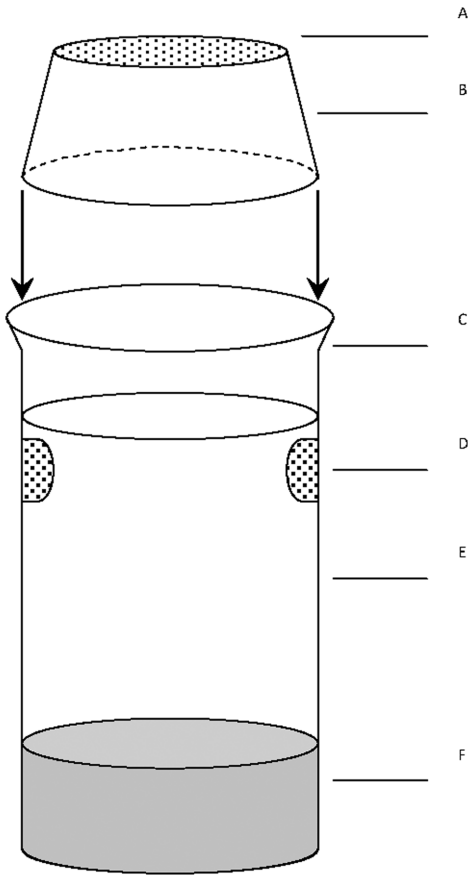
(*) Međutim, treba imati na umu da, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane tvari, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije koristiti medij Elendt M4).

▼**M4**

Dodatak 5.

Smjernice za praćenje preobrazbe ličinki trzalaca

U ispitne laboratorijske čaše postave se zamke za preobražene životinje. Te su zamke potrebne od 20. dana do kraja ispitivanja. Slijedi crtež primjera korištenih zamki:



A: najlonski zaslon

B: obrnute plastične čaše

C: laboratorijska čaša za izlaganje bez usnika

D: priključci na zaslonu za promjenu vode

E: voda

F: sediment

▼M4

C.29. LAKA BIORAZGRADIVOST - CO_2 U ZAČEPLJENIM POSUDAMA (TEST PLINSKOG PROSTORA (HEADSPACE))

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 310 (2006.). Ova ispitna metoda je metoda probira za evaluaciju lake biorazgradivosti kemikalija, a informacije sadržane u njoj slične su informacijama o šest metoda opisanih u poglavlju C.4 Priloga A do F. Dakle, kemikalija koja pokazuje pozitivne rezultate u ovoj ispitnoj metodi može se smatrati lako biorazgradivom te, slijedom toga, i brzo razgradivom u okolišu.

2. Poznata metoda za određivanje ugljikovog dioksida (CO_2) (1), utemeljena na Sturmovom izvornom testu (2) za procjenu biorazgradivosti organskih kemikalija, obično je, zbog mjerenja ugljikova dioksida koji nastaje djelovanjem mikroba, prvi izbor za ispitivanje slabo topljivih kemikalija i jako adsorptivnih kemikalija. Također se odabire i za topljive (ali nehlapljive) kemikalije jer mnogi smatraju da je nastajanje ugljikova dioksida jedini nedvosmisleni dokaz djelovanja mikroba. Na opadanje otopljenog organskog ugljika mogu utjecati fizikalno-kemijski procesi - adsorpcija, hlapljenje, precipitacija (taloženje), hidroliza - kao i djelovanje mikroba, a i u mnogim nebiološkim reakcijama troši se kisik; rijetko kad CO_2 nastaje od organskih kemikalija abiotički. U izvornom i izmijenjenom Sturmovom testu (1)(2) do opadanja CO_2 dolazi u tekućem stanju u apsorpcijske posude propuhivanjem (tj. tretiranjem mjehurića zraka da uklanjaju CO_2 iz tekućeg medija), dok se u Larsonovoj verziji (3)(4) CO_2 transferira iz reakcijske posude do apsorbera propuštanjem zraka bez CO_2 kroz plinski prostor te naknadnim neprestanim protresanjem ispitne posude. Samo se u Larsonovoj izmijenjenoj verziji protresa reakcijska posuda; miješanje se nalaže samo za netopljive tvari u ISO 9439 (5) i u izvornoj verziji iz SAD-a (6), a u objema se nalaže prije propuhivanje negoli zamjena količine u plinskom prostoru. U drugoj službenoj američkoj EPA metodi (7), koja se temelji na Gledhillovoj metodi (8), protresena reakcijska posuda zatvara se, a nastali CO_2 skuplja se u unutarnji alkalni odvajač izravno iz plinovitog stanja, kao i u klasičnim Warburg/Barcroftovim respirometrijskim tikvicama.

3. Međutim, pokazalo se da se anorganski ugljik (IC) akumulira u mediju tijekom primjene standardnog, izmijenjenog Sturmova testa na čitav niz kemikalija (9). Pronađena je koncentracija IC-a od čak 8 mg/l tijekom razgradnje 20 mg C/l anilina. Dakle, skupljanje CO_2 u alkalnim odvajačima nije dobro odrazilo pravu količinu CO_2 koja nastaje djelovanjem mikroba u različitim trenucima tijekom razgradnje. Kao rezultat toga, specifikacija da se > 60 % teoretskog maksimuma CO_2 ($ThCO_2$) mora skupiti u „roku od 10 dana” (10 dana neposredno nakon postizanja 10 % biorazgradnje) da bi se ispitivana kemikalija razvrstala kao lako biorazgradiva neće biti ispunjena za neke kemikalije koje bi se tako razvrstale opadanjem otopljenog organskog ugljika (DOC).

4. Kada je postotak razgradnje niža vrijednost od očekivane, moguće je da se IC akumulira u ispitnoj otopini. Tada se razgradivost može procijeniti nekim drugim testovima biorazgradivosti.

▼M4

5. Ostali nedostaci Sturmove metodologije (nespretna, vremenski zahtjevna, podložnija pokusnoj greški i neprimjenjiva na hlapljive kemikalije) davno su potaknuli potragu za tehnikom začepljenih posuda drukčijom od Gledhillove, radije nego protoku plina (10)(11). Boatman i sur. (12) revidirali su ranije metode i usvojili sustav zatvorenog plinskog prostora u kojemu se CO_2 ispušta u plinski prostor na kraju inkubacije acidifikacijom medija. CO_2 se mjerio analizom plinskom kromatografijom (GC)/IC u automatski uzimanim uzorcima plinskog prostora, ali se u obzir nije uzimao otopljeni anorganski ugljik (DIC) u tekućem stanju. Isto tako, i korištene su posude bile vrlo male (20 ml), a sadržavale su svega 10 ml medija, što je izazvalo poteškoće, npr. pri dodavanju vrlo malih količina netopljivih ispitivanih kemikalija, i/ili možda mikroorganizmi nisu u dovoljnoj mjeri ili uopće prisutni u inokuliranom mediju da bi mogli razgraditi ispitivane kemikalije.

6. Te su poteškoće nadvladane u neovisnim studijama autora Strujisa i Stoltenkampa (13) te Bircha i Fletchera (14), od kojih su potonji bili nadahnuti svojim iskustvom s aparaturom korištenom u testu anaerobne biorazgradnje (15). U prethodnoj se metodi (13) CO_2 mjeri u plinskom prostoru nakon acidifikacije i uravnoteženja, dok se u potonjoj metodi (14) mjeri DIC i u plinovitom i u tekućem stanju, bez tretmana; u tekućem je stanju bilo prisutno više od 90 % nastalog IC-a. Prednost obiju metoda nad Sturmovim testom jest u tome da je sustav ispitivanja kompaktniji i lakši za upravljanje, mogu se ispitivati i nehlapljive kemikalije, a izbjegava se i vjerojatnost odgode u mjerenju nastalog CO_2.

7. Oba ta pristupa kombinirana su u normi ISO Headspace CO_2 (16), koja je ispitana u prstenastom testu (17), a upravo se na toj normi i temelji ova ispitna metoda. Slično tomu, ta su dva pristupa korištena i u američkoj EPA metodi (18). Preporučuju se dvije metode mjerenja CO_2, naime, CO_2 u plinskom prostoru nakon acidifikacije (13) i IC u tekućem stanju nakon dodavanja viška lužina. Potonju je metodu uveo Peterson tijekom CONCAWE prstenastog testa (19) ove metode mjerenja u plinskom prostoru koja je izmijenjena kako bi se mjerila svojstvena biorazgradivost. Izmjene načinjene u reviziji ove metode iz 1992. godine (20) iz poglavlja C.4 ovog Priloga za laku biorazgradivost obuhvaćene su ovom ispitnom metodom pa su uvjeti (medij, trajanje itd.) i inače jednaki onima iz revidiranog Sturmova testa (20). Birch i Fletcher (14) pokazali su da se ovim testom plinskog prostora dobivaju rezultati vrlo slični onima koji se dobiju prstenastim testom OECD-a istih kemikalija (21) revidiranih ispitnih metoda.

NAČELO ISPITIVANJA

8. Ispitivana kemikalija, obično u koncentraciji od 20 mg C/l, kao jedini izvor ugljika i energije, inkubira se u puferskom mediju s mineralnim solima koji je inokuliran miješanom populacijom mikroorganizama. Test se provodi u začepljenim bocama u kojima se u plinskom prostoru nalazi zrak, koji predstavlja zalihu kisika za aerobnu biorazgradnju. Razvijanje CO_2 koje nastaje kao rezultat konačne aerobne biorazgradnje ispitivane kemikalije određuje se mjerenjem viška IC-a nastalog u ispitnim bocama u usporedbi s onim nastalim u posudama sa slijepim probama koje sadržavaju samo inokulirani medij. Stupanj biorazgradnje izražava se kao postotak teoretskog maksimuma proizvodnje IC-a (ThIC), i to na temelju količine ispitivane kemikalije (kao organskog ugljika) koja se dodala na početku.

9. Također se mogu mjeriti i opadanje DOC-a i/ili stupanj primarne biorazgradnje ispitivane kemikalije (20).

▼M4

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

10. Sadržaj organskog ugljika (% w/w) ispitivane kemikalije mora biti poznat bilo iz njezine kemijske strukture bilo mjerenjem kako bi se mogao izračunati postotak razgradnje. Za hlapljive ispitivane kemikalije izmjerena ili izračunata konstanta Henryjevog zakona pomaže u određivanju odgovarajućeg omjera volumena plinskog prostora i tekućine. Podaci o toksičnosti ispitivane kemikalije na mikroorganizme pomažu u odabiru odgovarajuće ispitne koncentracije i tumačenju rezultata koji pokazuju slabu biorazgradivost: preporučuje se da se ubaci i kontrola inhibicije, osim ako već nije poznato da ispitivana kemikalija nema inhibitorni učinak na djelovanje mikroba (vidjeti stavak 24.).

PRIMJENJIVOST METODE

11. Ovaj se test može primijeniti na ispitivane kemikalije topljive u vodi i netopljive premda treba osigurati dobro dispergiranje ispitivane kemikalije. Pomoću preporučenog omjera volumena plinskog prostora i tekućine od 1:2 mogu se ispitivati hlapljive kemikalije s konstantom Henryjeva zakona do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ pošto udio ispitivane kemikalije u plinskom prostoru neće biti veći od 1 % (13). Manji volumen plinskog prostora može se koristiti pri ispitivanju kemikalija koje su hlapljivije, ali je moguće da je ograničavajuća njihova biodostupnost, posebno ako su one slabo topljive u vodi. Međutim, korisnici moraju osigurati da omjer volumena plinskog prostora i tekućine, kao i koncentracija ispitivane kemikalije, budu takvi da je dostupno dovoljno kisika za potpunu aerobnu biorazgradnju (npr. izbjegavati uporabu visoke koncentracije supstrata i malog volumena plinskog prostora). Smjernice o tome nalaze se u (13)(23).

REFERENTNE KEMIKALIJE

12. Kako bi se provjerio postupak ispitivanja, paralelno treba ispitivati referentnu kemikaliju čija je biorazgradivost već poznata. U tu se svrhu mogu koristiti anilin, natrijev benzoat ili etilen-glikol za ispitivanje ispitivanih kemikalija topljivih u vodi te 1-oktanol za slabo topljive ispitivane kemikalije (13). Biorazgradnja tih kemikalija mora u roku od 14 dana doseći > 60 % ThIC-a.

MJERNA OBNOVLJIVOST

13. U ISO prstenastom testu ove metode (17) dobiveni su sljedeći rezultati u preporučenim uvjetima, uključujući i 20 mg C ispitivane kemikalije/l.

Ispitivana kemikalija	Srednja vrijednost postotka biorazgradnje (28d)	Koeficijent varijacije (%)	Broj laboratorija
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Varijabilnost unutar testa (mjerna obnovljivost) je, pomoću anilina, bila niska, a koeficijent varijabilnosti nije bio veći od 5 % u gotovo svim ispitnim nizovima. U dva slučaja u kojima je mjerna obnovljivost bila lošija, veća varijabilnost je vjerojatno bila rezultat velike proizvodnje IC-a u slijepim probama. Mjerna obnovljivost je bila gora s 1-oktanolom, ali je još uvijek bila manja od 10 % za 79 % ispitnih nizova. Ta je veća varijabilnost unutar testa vjerojatno bila rezultat grešaka u doziranju jer se mala količina (3 do 4 µl) 1-oktanola morala ubrizgati u začepljene ispitne boce. Veći bi koeficijenti varijacije rezultirali nižim koncentracijama ispitivane kemikalije od onih korištenih, posebno na koncentracijama ispod 10 mg C/l. To bi se moglo djelomice nadvladati snižavanjem koncentracije ukupnog anorganskog ugljika (TIC) u inokulumu.

▼M4

14. U prstenastom testu EU-a (24), u kojemu je ispitivano pet surfaktanata dodanih u koncentraciji od 10 mg C/l, dobiveni su sljedeći rezultati:

Ispitivana kemikalija	Srednja vrijednost postotka biorazgradnje (28d)	Koeficijent varijacije (%)	Broj laboratorija
Tetrapropilen Benzen sulfonat	17	45	10
Di-izo-oktilsulfosukcinat (anionski)	72	22	9
Heksadecil-trimetil (*) Amonijak klorid (kationski)	75	13	10
Izo-nonilfenol-(etoksilat)$_9$ (neionski)	41	32	10
Koko-amid-propil Dimetilhidroksi Sulfobetain (amfoterni)	60	23	11

(*) Dodan je SiO_2 radi neutralizacije toksičnosti.

Rezultati pokazuju da je, općenito, varijabilnost bila veća za slabije razgrađene surfaktante. Varijabilnost unutar testa bila je manja od 15 % za više od 90 % slučajeva, a najviša je bila od 30-40 %.

NAPOMENA: Većina surfaktanata ne sadrže samo jednu molekulu, nego su mješavina izomera, homologa itd., koji se razgrađuju po isteku različitih karakterističnih razdoblja odgode i različitim kinetičkim brzinama, što rezultira „zamućenim”, izlomljenim krivuljama, tako da je moguće da se prolazna vrijednost od 60 % neće doseći u „roku od 10 dana” premda bi svaka pojedinačna molekularna vrsta dosegla > 60 % u roku od 10 dana da je sama ispitivana. To se primjećuje i kod drugih kompleksnih smjesa.

OPIS METODE

Aparatura

15. Uobičajena laboratorijska aparatura i:

(a) Staklene serum boce, začepljene čepovima od butilnog kaučuka i aluminijskim brtvama na navrtanje. Preporučena veličina je „125 ml” s ukupnim volumenom od oko 160 ml (u tom bi slučaju volumen svake boce trebao biti poznat i iznositi 160 ± 1 ml). Manja veličina posuda može se koristiti ako rezultati ispunjavaju uvjete opisane u stavcima 66. i 67.;

(b) Analizator ugljika ili neki drugi instrument (npr. plinski kromatograf) za mjerenje anorganskog ugljika;

▼M4

(c) Šprice velike preciznosti za uzorke plina i tekućine;

(d) Orbitalna miješalica u okruženju s kontroliranom temperaturom;

(e) Dovod zraka bez CO_2 - to se može pripremiti propuštanjem zraka kroz granule natronskog vapna ili korištenjem smjese plina u omjeru 80 % N_2/20 % 0_2 (opcijski) (vidjeti stavak 28.);

(f) Uređaj za membransku filtraciju propusnosti od 0,20 - 0,45 μm (fakultativno),

(g) Analizator organskog ugljika (fakultativno).

Reagensi

16. Tijekom cijelog testa koristite reagense analitičke čistoće.

Voda

17. Treba koristiti destiliranu ili deioniziranu vodu koja sadržava ≤ 1 mg/l ukupnog organskog ugljika. To predstavlja ≤ 5 % početnog sadržaja organskog ugljika koji je uveden na preporučenu dozu ispitivane kemikalije.

Radne otopine za medij s mineralnim solima

18. Radne otopine i medij s mineralnim solima slični su testovima iz norme ISO 14593 (16) i poglavlja C.4 „Laka biorazgradivost" (20). Uporaba više koncentracije amonijakova klorida (2,0 g/l umjesto 0,5 g/l) potrebna je samo u vrlo iznimnim slučajevima, npr. kad je koncentracija ispitivane kemikalije > 40 mg C/l. Radne otopine treba čuvati u hladnjaku i baciti ih nakon šest mjeseci ili ranije ako ima dokaza precipitacije ili rasta mikroba. Pripremiti sljedeće radne otopine:

(a) Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Amonijakov klorid (NH_4Cl) 0,50 g

Otopiti u vodi i načiniti 1 litru. pH te otopine treba iznositi 7,4 (± 0,2). Ako to nije slučaj, pripremiti novu otopinu.

(b) Kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Otopiti u vodi i načiniti 1 litru.

(c) Magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Otopiti u vodi i načiniti 1 litru.

(d) Željezov (III) klorid heksahidrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25g

Otopiti u vodi i načiniti 1 litru pa dodati kapljicu koncentrata.

Priprema mineralnog medija

19. Pomiješati 10 ml otopine (a) s približno 800 ml vode (stavak 17.), potom dodati 1 ml otopina (b), (c) i (d) te načiniti 1 litru pomoću vode (stavak 17.).

Ostali reagensi

20. Koncentrirana orto-fosforna kiselina (H_3PO_4) (> 85 % mase po volumenu).

▼M4

Otopina s natrijevim hidroksidom 7M

21. Otopiti 280 g natrijeva hidroksida (NaOH) u 1 litri vode (stavak 17.). Odrediti koncentraciju DIC-a te otopine i u obzir uzeti tu vrijednost pri izračunu rezultata testa (vidjeti stavke 55. i 61.), posebno u svjetlu validacijskog kriterija iz stavka 66. točke (b). Pripremiti svježu otopinu ako je previsoka koncentracija DIC-a.

Ispitivana kemikalija

22. Pripremiti u vodi radnu otopinu ispitivane kemikalije koja je dovoljno topljiva u vodi (stavak 17.) ili u ispitnom mediju (stavak 19.) na koncentraciji po mogućnosti 100-struko većoj od konačne koncentracije koja će se koristiti u testu; možda će biti neophodno podesiti pH radne otopine. Radnu otopinu treba dodati mineralnom mediju da se postigne konačna koncentracija organskog ugljika od 2 do 4 mg C/l, po mogućnosti 20 mg C/l. Ako se koriste niže koncentracije, možda će biti narušena dobivena preciznost. U posude se mogu dodavati i topljive i netopljive tekuće kemikalije, i to izravno pomoću šprica velike preciznosti. Možda će slabo topljive i netopljive ispitivane kemikalije trebati posebno tretirati (25). Na izboru stoje:

(a) izravno dodavanje poznatih vaganih količina;

(b) ultrazvučno dispergiranje prije dodavanja;

(c) dispergiranje pomoću emulgatora potrebnih da bi se utvrdilo imaju li ikakav inhibitorni ili stimulacijski učinak na djelovanje mikroba prije dodavanja;

(d) adsorpcija tekućih ispitivanih kemikalija ili otopina u prikladno hlapljivom otapalu na neki inertni medij ili nosač (npr. filtar od staklenih vlakana), a potom i isparavanje otapala i izravno dodavanje poznatih količina;

(e) dodavanje poznatog volumena otopine ispitivane kemikalije u lako hlapljivom otapalu u praznu ispitnu posudu, a potom i isparavanje otapala.

Sredstva ili otapala korišteni u točkama (c), (d) i (e) moraju biti ispitana na stimulacijski ili inhibitorni učinak na djelovanje mikroba (vidjeti stavak 42. točku (b)).

Referentna kemikalija

23. Pripremiti radnu otopinu (topljive) referentne kemikalije u vodi (stavak 17.) u koncentraciji po mogućnosti 100 puta većoj od konačne koncentracije koja će se koristiti (20 mg C/l) u testu.

Provjera inhibicije

24. Ispitivane kemikalije obično ne pokazuju značajnije znakove razgradnje u uvjetima korištenima u procjena lake biorazgradivosti. Jedan od mogućih uzroka jest taj da ispitivana kemikalija ima inhibitorni učinak na inokulum na koncentraciji korištenoj u testu. U plan ispitivanja može se stoga uključiti i provjera inhibicije kako bi se olakšala identifikacija (retrospektivno) inhibicije kao mogućeg uzroka ili čimbenika koji pridnosi tom učinku. Kao druga mogućnost, provjerom inhibicije mogu se isključiti takve interferencije i može se pokazati da se nulta ili slaba razgradnja mogu pripisati isključivo nepodložnosti na napad mikroba u uvjetima testa. Da bi se dobili podaci o toksičnosti ispitivane kemikalije na (aerobne) mikroorganizme, pripremiti otopinu u ispitnom mediju koji sadržava ispitivanu kemikaliju i referentnu kemikaliju (stavak 19.), od kojih je svaka u istoj koncentraciji kao i pri dodavanju (vidjeti stavke 22. i 23.).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum se može izvesti iz niza izvora: aktivnog mulja, izlaznih otpadnih voda (bez klora), površinskih voda i tala ili iz kombinacije tih izvora (20). Biorazgradivo djelovanje izvora treba provjeriti pomoću referentne kemikalije. Bez obzira na to koji je izvor, ne bi trebalo koristiti mikroorganizme koji su prethodno izlagani ispitivanoj kemikaliji ako se postupkom želi ispitati laka biorazgradivost.

Upozorenje: Aktivni mulj, otpadne vode i izlazna voda nakon pročišćavanja otpadnih voda sadržavaju patogene organizme i s njima se mora rukovati oprezno.

26. Iskustvo pokazuje da je optimalni volumen za inokulum onaj koji:

— je dostatan za poticanje odgovarajućeg biorazgradivog djelovanja;

— razgrađuje referentnu kemikaliju u propisanom postotku (vidjeti stavak 66.),

— proizvodi 10^2 do 10^5 jedinica koje tvore kolonije po mililitru u konačnoj smjesi;

— obično proizvodi koncentraciju od 4 mg/l suspendiranih krutih tvari u konačnoj smjesi kada se koristi aktivni mulj, mogu se koristiti koncentracije do 30 mg/l, ali one mogu značajno povećati proizvodnju CO_2 u slijepim probama (26);

— pridonosi s manje od 10 % početne koncentracije organskog ugljika koji je uvela ispitivana kemikalija;

— općenito predstavlja 1-10 ml inokuluma na 1 litru ispitne otopine.

Aktivni mulj

27. Aktivni se mulj nanovo skuplja iz aeracijskog bazena postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili iz dozračne posude laboratorijske jedinice u kojima se pročišćavaju pretežno komunalne otpadne vode. Ako je to potrebno, treba ukloniti grube čestice prosijavanjem (npr. primjenom sita veličine mrežice od 1 mm^2), a mulj treba održavati u aerobnom stanju do uporabe.

28. Kao druga mogućnost, nakon uklanjanja svih grubih čestica treba pustiti da se mulj istaloži ili ga centrifugirati (npr. 1 100 × g na 10 minuta). Baciti tekući supernatant. Mulj se može prati u mineralnoj otopini. Suspendirati koncentrirani mulj u mineralnom mediju kako bi se dobila koncentracija od 3-5 g suspendirane krute tvari/l. Potom dozračivati do uporabe.

29. Mulj treba uzeti iz ispravnog konvencionalnog postrojenja za pročišćavanje. Ako se mulj treba uzeti iz postrojenja za pročišćavanje velikih brzina ili ako se smatra da mulj sadržava inhibitore, treba ga oprati. Pustiti da se resuspendirani mulj istaloži ili ga centrifugirati nakon temeljitog miješanja, baciti tekući supernatant pa ponovno suspendirati oprani mulj u još jednoj količini mineralnog medija. Ponavljati taj postupak sve dok se ne bude smatralo da u mulju više nema viška supstrata ili inhibitora.

30. Nakon potpunog resuspendiranja ili kod neobrađenog mulja uzeti uzorak neposredno prije uporabe za određivanje suhe mase suspendiranih krutih tvari.

31. Još jedna mogućnost jest homogenizirati aktivni mulj (3-5 g suspendirane krute tvari/l). Tretirati mulj u Waring miješalici dvije minute na srednjoj brzini. Pustiti 30 minuta da se izmiješani mulj istaloži, ili dulje ako je potrebno, pa izliti tekućinu za uporabu u vidu inokuluma brzinom od oko 10 mg/l mineralnog medija.

▼M4

32. Daljnje smanjenje proizvodnje CO_2 u slijepim probama može se postići dozračivanjem mulja preko noći zrakom bez CO_2. Upotrijebiti 4 mg/l krute tvari aktivnog mulja kao koncentraciju inokuluma u ovom testu (13).

Sekundarne otpadne vode

33. Druga mogućnost je da se inokulum dobije iz sekundarnih otpadnih voda iz postrojenja za pročišćavanje ili laboratorijske jedinice u koje se pretežno dodaju komunalne otpadne vode. Održavati uzorak u aerobnim uvjetima i upotrijebiti ga na dan skupljanja ili ga, po potrebi, prethodno kondicionirati. Otpadne vode treba filtrirati kroz grubi filtar kako bi se uklonile grube lebdeće čestice, a potom se mjeri pH vrijednost.

34. Za smanjenje sadržaja IC-a filtrat se 1 h propuhuje zrakom bez CO_2 (stavak 15. točka (e)) dok se pH održava na 6,5 pomoću ortofosforne kiseline (stavak 20.). pH vrijednost vraća se na početnu vrijednost pomoću natrijeva hidroksida (stavak 21.), a nakon taloženja od oko 1 h za inokulaciju se uzima prikladna količina supernatanta. Tim se postupkom propuhivanja smanjuje sadržaj IC-a u inokulumu. Primjerice, ako se kao inokulum koristila maksimalna preporučena količina filtriranih propuhanih otpadnih voda (100 ml) po litri, količina IC-a prisutna u posudama s kontrolnom slijepom probom kretala se u rasponu od 0,4 do 1,3 mg/l (14), što predstavlja 2-6,5 % ispitivane kemikalije C na 20 mg C/l i 4-13 % na 10 mg C/l.

Površinske vode

35. Treba uzeti uzorak prikladnih površinskih voda. Njega treba čuvati u aerobnim uvjetima i upotrijebiti ga na dan uzimanja. Uzorak treba biti koncentriran, ako je to potrebno, filtriranjem ili centrifugiranjem. Količina inokuluma koja će se upotrijebiti u svakoj ispitnoj posudi treba ispunjavati kriterije iz stavka 26.

Tla

36. Treba uzeti uzorak prikladnog tla, koji se uzima na dubini do 20 cm ispod površine tla. Iz uzorka tla treba odstraniti kamenčiće, ostatke biljaka i beskralježnjake prije nego što se on prosije kroz mrežicu veličine 2 mm (ako je uzorak premokar da bi ga se smjesta moglo prosijati, djelomice ga osušiti na zraku kako bi se olakšalo prosijavanje). Treba ga držati u aerobnim uvjetima i upotrijebiti na dan uzimanja (ako se uzorak prenosi u labavo vezanoj vrećici od crnog polietilena, može se držati na 2 do 4 °C u toj vrećici do mjesec dana).

Prethodno kondicioniranje inokuluma

37. Inokulum se može prethodno kondicionirati na uvjete pokusa, ali se ne smije prethodno prilagoditi ispitivanoj kemikaliji. Prethodno kondicioniranje može smanjiti stvaranje CO_2 u slijepim probama. Prethodno se kondicioniranje sastoji od dozračivanja aktivnog mulja nakon razrjeđivanja u ispitnom mediju do 30 mg/l vlažnim zrakom bez CO_2 od 5-7 dana na ispitnoj temperaturi.

POSTUPAK ISPITIVANJA

Broj boca

38. Broj boca (stavak 15. točka (a)) potrebnih za ispitivanje ovisit će o učestalosti analiza i trajanju ispitivanja.

39. Preporučuje se da se analiziraju tri boce nakon dovoljnog broja vremenskih razmaka takvih da se može identificirati rok od 10 dana. Isto tako, na kraju ispitivanja analizira se najmanje pet boca (stavak 15. točka (a)) iz setova (a), (b) i (c) (vidjeti stavak 42.) kako bi se omogućilo da se izračuna 95 % intervala pouzdanosti za srednju vrijednost postotka biorazgradnje.

▼M4

Inokulirani medij

40. Inokulum se koristi na koncentraciji od 4 mg/l suhe tvari aktivnog mulja. Neposredno prije uporabe pripremiti dovoljnu količinu inokuliranog medija dodavanjem, primjerice, 2 ml prikladno tretiranog aktivnog mulja (stavci 27. do 32.) na 2 000 mg/l u 1 litru medija s mineralnim solima (stavak 19.). Ako se trebaju koristiti sekundarne otpadne vode, dodaje se do 100 ml otpadnih voda (stavak 33.) u 900 ml medija s mineralnim solima (stavak 19.) i razrijedi se medijem u 1 litru.

Priprema boca

41. Alikvoti inokuliranog medija stavljaju se u boce za višestruka određivanja kako bi se dobio omjer plinskog prostora i tekućine od 1:2 (npr. dodati 107 ml u boce zapremine od 160 ml). Mogu se koristiti i drugi omjeri, ali vidjeti upozorenja u stavku 11. Kada se koristi neka druga vrsta inokuluma, mora se pobrinuti da se inokulirani medij propisno promiješa kako bi se osiguralo da je ravnomjerno raspoređen u ispitnim bocama.

42. Pripremaju se setovi boca (stavak 15. točka (a)) koje sadržavaju:

(a) Ispitne boce (obilježene s F_T) koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju;

(b) Kontrole sa slijepim probama (obilježene s F_B) koje sadržavaju samo ispitni medij plus inokulum; također se moraju dodati i sve kemikalije, otapala, sredstva ili filtri od staklenih vlakana koji su se koristili za uvođenje ispitivane kemikalije u ispitne posude;

(c) Posude (obilježene s F_C) za provjeru postupka koje sadržavaju referentnu kemikaliju;

(d) Ako je to potrebno, posude (obilježene s F_I) za provjeru mogućeg inhibitornog učinka ispitivane kemikalije koje sadržavaju i ispitivanu kemikaliju i referentnu kemikaliju u istim koncentracijama (stavak 24.) kao i u bocama F_T i F_C;

(e) Posude (obilježene s F_S) za provjeru moguće abiotičke razgradnje kao (a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ ili sterilizirane na neki drugi način (npr. u autoklavu).

43. Ispitivane i referentne kemikalije topljive u vodi dodaju se kao vodene radne otopine (stavci 22., 23. i 24.) kako bi se dobila koncentracija od 10 do 20 mg C/l.

44. Netopljive ispitivane kemikalije i netopljive referentne kemikalije dodaju se u boce na niz načina (vidjeti stavak 22. točke (a) do (e)) ovisno o naravi ispitivane kemikalije, bilo prije bilo poslije dodavanja inokuliranog medija, ovisno o metodi obrade ispitivane kemikalije. Ako se koristi jedan od postupaka iz stavka 22. točaka (a) do (e), boce sa slijepim probama F_B (stavak 42. točka (b)) treba tretirati na sličan način, ali bez ispitivane kemikalije ili referentne kemikalije.

45. Hlapljive ispitivane kemikalije treba ubrizgati u začepljene bode (stavak 47.) pomoću mikrošprice. Doza se izračunava iz ubrizgane količine i gustoće ispitivane kemikalije.

46. U posude treba dodati vodu, ako je to potrebno, kako bi u svakoj posudi bio isti volumen tekućine. Mora se osigurati da omjer plinskog prostora i tekućine (obično 1:2) i koncentracija ispitivane kemikalije budu takvi da u plinskom prostoru ima dovoljno kisika za potpunu biorazgradnju.

▼M4

47. Potom se sve boce začepljuju, primjerice čepovima od butilnog kaučuka i aluminija. U ovoj fazi treba dodati hlapljive ispitivane kemikalije (stavak 45.). Ako treba pratiti pad koncentracije DOC-a u ispitnoj otopini kao i za provedbu analize u nultom vremenu za početnu koncentraciju IC-a (sterilne kontrole, stavak 42. točka (e)) ili druge determinante, iz ispitne posude uzima se odgovarajući uzorak. Potom se ispitna posuda i njezin sadržaj bacaju.

48. Začepljene bode stavljaju se na kružnu mućkalicu (stavak 15. točka (d)), a brzina mućkanja mora biti dovoljna da sadržaj boce bude dobro promiješan i u suspenziji (npr. 150 do 200 opm), te se inkubiraju u mraku na 20 °C, a temperatura se mora održavati na ± 1 °C.

Uzorkovanje

49. Režim uzorkovanja ovisit će o fazi prilagodbe i kinetičkoj brzini biorazgradnje ispitivane kemikalije. Boce se žrtvuju za analizu na dan uzorkovanja, što bi se trebalo događati najmanje jedanput tjedno ili češće (npr. dvaput tjedno) ako je potrebna krivulja potpune razgradnje. Potrebni broj boca za višestruko određivanje uzima se iz mućkalice i predstavljaju F_T, F_B i F_C te, ako se koriste, i F_I i F_S (vidjeti stavak 42.). Test se obično provodi 28 dana. Ako krivulja biorazgradnje naznačuje da je plato postignut prije 28 dana, test se može završiti i ranije. Za analizu uzeti uzorke iz pet boca rezerviranih za 28. dan testa te rezultate iskoristiti za izračun granica pouzdanosti ili koeficijenta varijacije postotka biorazgradnje. Boce koje predstavljaju provjere inhibicije i abiotičke razgradnje ne trebaju se uzorkovati toliko često kao druge boce; dovoljno ih je uzorkovati 1. i 28. dana.

Analiza anorganskog ugljika (IC)

50. Proizvodnja CO_2 u bocama određuje se mjerenjem porasta koncentracije anorganskog ugljika (IC) tijekom inkubacije. Na raspolaganju su dvije preporučene metode za mjerenje količine IC-a proizvedene u testu, a slijedi njihov opis. Budući da te metode mogu dati malo različite rezultate, u ispitnom nizu treba koristiti samo jednu.

51. Metoda (a) preporučuje se ako je vjerojatno da medij sadržava ostatke, primjerice, papira filtra od staklenih vlakana i/ili netopljive ispitivane kemikalije. Ta se analiza može provoditi plinskim kromatografom ako nije dostupan analizator ugljika. Važno je da boce budu na ili blizu ispitne temperature kad se analizira plin u plinskom prostoru. Metoda (b) može biti lakša za laboratorije koji se koriste analizatorom ugljika za mjerenje IC-a. Važno je da se otopina natrijeva hidroksida (stavak 21.) upotrijebljena za pretvaranje CO_2 u karbonat ili svježe pripremi ili da bude poznat njezin sadržaj IC-a kako bi se to moglo uzeti u obzir pri izračunu rezultata testa (vidjeti stavak 66. točku (b)).

Metoda (a): acidifikacija na pH < 3

52. Prije svake serije analiza kalibrira se analizator IC-a primjenom odgovarajućeg standarda IC-a (npr. 1 % w/w CO_2 u N_2). Koncentrirana ortofosforna kiselina (stavak 20.) ubrizgava se kroz septum svake uzorkovane boce radi snižavanja pH-a medija na < 3 (npr. dodati 1 ml u 107 ml ispitnog medija). Boce se ponovno vraćaju na mućkalicu. Nakon mućkanja od sat vremena na ispitnoj temperaturi boce se skidaju s mućkalice, iz plinskog prostora svake boce uzimaju se alikvoti (npr. 1 ml) plina i isti se ubrizgavaju u analizator IC-a. Izmjerene koncentracije IC-a bilježe se kao mg C/l.

▼M4

53. Načelo ove metode jest da, nakon acidifikacije na pH < 3 i uravnoteženja na 20 °C, konstanta uravnoteženja za raspodjelu CO_2 između tekućeg i plinovitog stanja u ispitnim bocama iznosi 1,0 kada se mjeri kao koncentracija (13). To bi se trebalo pokazati za sustav ispitivanja najmanje jedanput na sljedeći način:

Postaviti boce koje sadržavaju 5 i 10 mg/l kao IC uporabom otopine anhidridnog natrijeva karbonata (Na_2 CO_3) u vodi bez CO_2 koja se priprema acidifikacijom vode na pH 6,5 koncentriranom ortofosfornom kiselinom (stavak 20.), propuhivanjem preko noći zrakom bez CO_2 te podizanjem pH lužinama do neutralnosti. Osigurati da omjer volumena plinskog prostora i volumena tekućine bude isti kao i u testu (npr. 1:2). Acidificirati i uravnotežiti na način opisan u stavku 52., potom izmjeriti koncentracije IC-a i plinovitog (plinski prostor) i tekućeg stanja. Provjeriti jesu li te dvije koncentracije jednake unutar pokusne greške. Ako to nije slučaj, operater treba revidirati postupke. Ta provjera raspodjele IC-a između tekućeg i plinovitog stanja ne treba se provoditi svaki put kad se provodi test; ista se vjerojatno može provesti pri kalibraciji.

54. Ako treba izmjeriti opadanje DOC-a (samo ispitivane kemikalije topljive u vodi), treba uzeti uzorke u tekućem stanju iz zasebnih (neacidificiraniih) boca, filtrirati ih kroz membranu i ubrizgati ih u analizator DOC-a. Te se boce mogu, po potrebi, koristiti i za druge analize kako bi se izmjerila primarna biorazgradnja.

Metoda (b): pretvaranje CO_2 u karbonat

55. Prije svake serije analiza kalibrira se analizator IC-a primjenom odgovarajućeg standarda, primjerice, otopine natrijeva bikarbonata ($NaHCO_3$) u vodi bez CO_2 (vidjeti stavak 53.) u rasponu od 0 do 20 mg/l kao IC. Otopina natrijeva hidroksida (7M, stavak 21.) (npr. 1 ml u 107 ml medija) ubrizgava se kroz septum svake uzorkovane boce, a boce se mućkaju 1 h na ispitnoj temperaturi. Koristiti istu otopinu NaOH na svim bocama žrtvovanima određenog dana, ali ne nužno u svim prilikama za uzorkovanje tijekom testa. Ako su u svim prilikama za uzorkovanje potrebne apsolutne vrijednosti IC-a u slijepim probama, trebat će odrediti IC otopine NaOH svaki put kad se ista koristi. Boce se skidaju s mućkalice i puštaju se da se istalože. Špricom se izvlače prikladne količine (npr. 50 do 1 000 µl) u tekućem stanju iz svake posude. Uzorci se ubrizgavaju u analizator IC-a i bilježe se koncentracije IC-a. Treba osigurati da je korišteni analizator propisno opremljen kako bi mogao analizirati lužnate uzorke koji nastaju u ovoj metodi.

56. Načelo ove metode jest da je, nakon dodavanja lužina i mućkanja, zanemariva koncentracija IC-a u plinskom prostoru. To treba provjeriti za sustav ispitivanja najmanje jedanput korištenjem standarda IC-a, dodavanjem lužina i uravnoteživanjem te mjerenjem koncentracije IC-a i u plinskom prostoru i u tekućem stanju (vidjeti stavak 53.). Koncentracija u plinskom prostoru treba biti blizu nule. Ta provjera virtualno potpune apsorpcije CO_2 ne mora se provoditi svaki put kad se provodi test.

57. Ako treba izmjeriti opadanje DOC-a (samo ispitivane kemikalije topljive u vodi), treba uzeti uzorke u tekućem stanju iz zasebnih boca (koje ne sadržavaju dodane lužine), filtrirati ih kroz membranu i ubrizgati ih u analizator DOC-a. Te se boce mogu, po potrebi, koristiti i za druge analize kako bi se izmjerila primarna biorazgradivost.

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Izračun rezultata

58. Pod pretpostavkom 100 %-tne mineralizacije ispitivane kemikalije u CO_2, višak ThIC-a proizvedenog u kontrolnim slijepim probama jednak je TOC-u koji se na početku testa dodaje u svaku ispitnu bocu, to jest:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

Ukupna masa (mg) anorganskog ugljika (TIC) u svakoj boci jest:

$$\text{TIC} = (\text{mg C u tekućini} + \text{mg C u plinskom prostoru}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Jednadžba [1]}$$

gdje je:

V_L = volumen tekućine u boci (litra),

CL = koncentracija IC-a u tekućini (mg/l kao ugljika),

VH = volumen plinskog prostora (litra),

CH = koncentracija IC-a u plinskom prostoru (mg/l kao ugljika).

Izračuni TIC-a za ove dvije analitičke metode koje se koriste za mjerenje IC-a u ovom testu opisane su u nastavku teksta u stavcima 60. i 61. Postotak biorazgradnje (*% D*) u svakom slučaju dobiva se ovako:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Jednadžba [2]}$$

gdje je:

TIC_t = mg TIC-a u ispitnoj boci u vrijeme t,

TIC_b = srednja vrijednost mg TIC-a u bocama sa slijepim probama u vrijeme t,

TOC = mg TOC-a dodanih na početnu u ispitnu posudu.

Izračunava se postotak biorazgradnje % D za ispitnu bocu (F_T), referentnu bocu (F_C) i, ako je i to obuhvaćeno, za kontrolne boce za praćenje inhibicije (F_I) iz odgovarajućih količina TIC-a proizvedenih do svakog trenutka uzorkovanja.

59. Ako je došlo do značajnog porasta sadržaja TIC-a u sterilnim kontrolama (F_S) tijekom trajanja testa, može se zaključiti da je došlo do abiotičke razgradnje ispitivane kemikalije i to se mora uzeti u obzir u izračunu D u jednadžbi [2].

Acidifikacija na pH < 3

60. Budući da acidifikacija na pH < 3 i uravnoteženje rezultiraju ujednačenjem koncentracije TIC-a u tekućem i plinovitom stanju, treba mjeriti samo koncentraciju IC-a u plinovitom stanju. Dakle, iz jednadžbe [1] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, gdje je V_B = volumen serum boce.

Pretvaranje CO_2 u karbonat

61. U ovoj se metodi izračuni provode kao u jednadžbi [1], ali se ignorira zanemariva količina IC-a u plinovitom stanju, to jest $V_H \times C_H = 0$, i $\text{TIC} = V_L \times C_L$.

▼M4

Izražavanje rezultata

62. Krivulja biorazgradnje dobiva se grafičkim prikazom postotka biorazgradnje D u ovisnosti o vremenu inkubacije i, ako je to moguće, naznačuju se faza prilagodbe, faza biorazgradnje, rok od 10 dana i faza platoa, to jest faza u kojoj je postignuta maksimalna razgradnja i u kojoj se izravnala krivulja biorazgradnje. Ako se za paralelne ispitne posude dobiju poredbeni rezultati F_T (< 20 % razlike), grafički se prikazuje srednja vrijednost krivulje (vidjeti Dodatak 2., slika 1.); a ako ne, krivulje se grafički prikazuju za svaku posudu. Određuje se srednja vrijednost postotka biorazgradnje u fazi platoa ili se procjenjuje najviša vrijednost (npr. kad krivulja opada u fazi platoa), ali je vrlo važno ocijeniti da u potonjem slučaju ta vrijednost ne bude netipična. Naznačiti maksimalnu razinu biorazgradnje kao „stupanj biorazgradnje ispitivane kemikalije" u izvješću o ispitivanju. Ako broj ispitnih posuda nije bio dovoljan za naznaku faze platoa, za izračun srednje vrijednosti koriste se podaci izmjereni posljednjeg dana testa. Ta posljednja vrijednost, srednja vrijednost pet višestrukih određivanja, služi kao naznaka preciznosti kojom je određen postotak biorazgradnje. Isto tako, treba izvijestiti i o vrijednosti dobivenoj po isteku roka od 10 dana.

63. Na isti se taj način grafički prikazuje krivulja za referentnu kemikaliju, F_C, te, ako je i to obuhvaćeno, i za provjeru abiotičke eliminacije, F_S, i za kontrolu inhibicije, F_I.

64. Bilježe se količine TIC-a u kontrolama sa slijepim probama (F_B), kao i one u tikvicama F_S (abiotička provjera) ako su te posude bile obuhvaćene testom.

65. Izračunati D za posude F_I, i to na temelju prinosa teoretskog IC-a očekivanog samo iz referentne komponente te smjese. Ako je, 28. dana $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, može se pretpostaviti da je ispitivana kemikalija inhibirala djelovanje inokuluma, a to može biti zaslužno za niske vrijednosti D_{FT} dobivene u uvjetima testa. U tom se slučaju test može ponoviti s nižom ispitnom koncentracijom te, po mogućnosti, smanjenjem DIC-a u inokulumu i TIC-a nastalog u kontrolama sa slijepim probama jer će niže koncentracije u protivnom smanjiti preciznost ove metode. Druga je mogućnost uporaba drugog inokuluma. Ako se u tikvici F_S (abiotička) zamijeti značajan porast (> 10 %) količine TIC-a, možda je došlo do procesa abiotičke razgradnje.

Valjanost rezultata

▼M7

66. Ispitivanje se smatra valjanim:

a) ako je srednja izmjerena vrijednost postotka razgradnje u posudama F_C koje sadržavaju referentnu kemikaliju > 60 % do 14. dana inkubacije i

b) ako je srednja izmjerena vrijednost količine TIC-a prisutna u kontrolama sa slijepim probama F_B na kraju ispitivanja < 3 mg C/l.

Ako nisu ispunjena ta ograničenja, ispitivanje bi trebalo ponoviti s inokulumom iz drugog izvora i/ili bi trebalo preispitati primijenjene postupke. Na primjer, ako je problem u visokoj proizvodnji IC-a u slijepim probama, trebalo bi slijediti postupak iz stavaka od 27. do 32.

(1) Postotak razgradnje u posudama F_C koje sadržavaju referentnu tvar.
(2) Postotak razgradnje u posudama F_I.

▼M4

67. Ako ispitivana kemikalija ne dosegne 60 % ThIC-a te ako se pokaže da ona nema inhibitorni učinak (stavak 65.), test se može ponoviti s povišenom koncentracijom inokuluma (do 30 mg/l aktivnog mulja i 100 ml otpadnih voda/l) ili s inokulumima iz drugih izvora, poglavito ako se razgradnja kretala u rasponu od 20 do 60 %.

Tumačenje rezultata

68. Biorazgradnja > 60 % ThIC-a u roku od 10 dana u ovom testu pokazuje da je ispitivana kemikalija lako biorazgradiva u aerobnim uvjetima.

69. Ako se ne postigne prolazna vrijednost od 60 %, odrediti pH vrijednost medija u bocama koji nije učinjen ni kiselim niti lužnatim; vrijednost niža od 6,5 mogla bi biti znak nitrifikacije. U takvom slučaju ponoviti test s puferskom otopinom više koncentracije.

Izvješće o ispitivanju

70. Sastaviti tablicu % D za svaku ispitnu bocu (F_T), referentnu bocu (F_C) i, ako je obuhvaćena, kontrolnu bocu za provjeru inhibicije (F_I) za svaki dan uzorkovanja. Ako se za boce za višestruko određivanje dobiju poredbeni rezultati, grafički prikazati krivulju srednje vrijednosti % D u ovisnosti o vremenu. Zabilježiti količinu TIC-a u kontrolama sa slijepim probama (F_B) i u sterilnim kontrolama (F_S), DOC-a i/ili drugih determinanti te postotak njihova opadanja.

71. Odrediti srednju vrijednost % D u fazi platoa ili koristiti najvišu vrijednost ako krivulja biorazgradnje opadne u fazi platoa, a to prijaviti kao „stupanj biorazgradnje ispitivane kemikalije”. Važno je osigurati da u potonjem slučaju najviša vrijednost ne bude netipična.

72. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija:

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula i relevantna fizikalno-kemijska svojstva;

— čistoća (nečistoće) ispitivane kemikalije.

Uvjeti ispitivanja:

— upućivanje na ovu ispitnu metodu;

— opis korištenog sustava ispitivanja (npr. zapremina posude, omjer plinskog prostora i tekućine, metoda miješanja itd.);

— primjena ispitivane kemikalije i referentne kemikalije na sustav ispitivanja: korištena ispitna koncentracija i količina ugljika dozirana u svaku ispitnu bocu, uporaba otapala;

— pojedinosti o korištenom inokulumu, sve prethodne obrade i prethodno kondicioniranje;

— temperatura inkubacije;

— validacija načela analize IC-a;

— osnovna svojstva korištenog analizatora IC-a (i sve ostale korištene analitičke metode);

— broj određivanja.

Rezultati:

— sirovi podaci i izračunate vrijednosti biorazgradivosti u obliku tablice;

▼M4

— grafikon postotka razgradnje u ovisnosti o vremenu za ispitivane i referentnim kemikalijama, fazi prilagodbe, fazi razgradnje, roku od 10 dana i nagibu;

— postotak opadanja na platou na kraju testa i po isteku roka od 10 dana;

— obrazloženje odbijanja rezultata ispitivanja;

— sve ostale činjenice relevantne za postupak koji se slijedio;

— rasprava o rezultatima.

LITERATURA

1. Poglavlje C.4 ovog Priloga Određivanje „lake” biorazgradivosti - test razvijanja CO_2 (metoda C.4-C).

2. Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

3. Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

4. Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

5. ISO 9439 (1990; revidirano 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8. Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

9. Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

10. Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

11. Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

12. Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

13. Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

14. Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

15. Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

16. ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

17. Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

18. US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19. Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

20. Poglavlje C.4 ovog Priloga, Određivanje „lake" biorazgradivosti.

21. OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Pariz.

22. Poglavlje C.11 ovog Priloga, Test inhibicije disanja aktivnog mulja.

23. Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

24. EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25. ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Dodatak 1.

KRATICE I DEFINICIJE

IC: Anorganski ugljik

$ThCO_2$: Teoretski ugljikov dioksid (mg) je izračunata količina ugljikova dioksida koja će nastati iz poznatog i izmjerenog sadržaja ugljika ispitivane kemikalije nakon njezine potpune mineralizacije; također se izražava i kao mg ugljikova dioksida koji nastane po mg ispitivane kemikalije.

DOC: Otopljeni organski ugljik je organski ugljik prisutan u otopini ili onaj koji prolazi kroz filtar veličine 0,45 mikrometara ili ostaci u supernatantu nakon centrifugiranja na približno 4 000 g (oko 40 000 m sec^{-2}) tijekom 15 min.

DIC: Otopljeni anorganski ugljik

ThIC: Teoretski anorganski ugljik

TIC: Ukupni anorganski ugljik

Lako biorazgradivo: Proizvoljno razvrstavanje kemikalija koje su prošle određene specificirane testove pretraživanja na konačnu biorazgradivost; ti su testovi toliko strogi da se pretpostavlja da će se takve kemikalije brzo i potpuno biorazgraditi u vodenom okolišu u aerobnim uvjetima.

Rok od 10 dana: 10 dana neposredno poslije postizanja 10 % biorazgradnje.

Svojstvena biorazgradivost: Razvrstavanje kemikalija za koje postoje nedvosmisleni dokazi biorazgradnje (primarne ili konačne) u bilo kojem ispitivanju biorazgradivosti.

Konačna aerobna biorazgradnja: Razina biorazgradnje koja se postigne kad mikroorganizmi u cijelosti prožmu ispitivanu kemikaliju, što rezultira proizvodnjom ugljikova dioksida, vode, mineralnih soli i novim mikrobnim staničnim sastojcima (biomasom).

Mineralizacija: Mineralizacija je potpuna biorazgradnja neke organske kemikalije u CO_2 i H_2O u aerobnim uvjetima te u CH_4, CO_2 i H_2O u anaerobnim uvjetima.

Faza prilagodbe (‚lag' faza): Vrijeme od početka testa do postizanja aklimatizacije i/ili prilagodbe razgrađujućih mikroorganizama i do porasta stupnja biorazgradnje ispitivane kemikalije ili organske tvari do zamjetne razine (npr. 10 % maksimalne teoretske biorazgradnje ili niže, ovisno o preciznosti tehnike mjerenja).

Faza razgradnje: Vrijeme od završetka faze prilagodbe do trenutka kad se postigne 90 % maksimalne razine razgradnje.

Stacionarna faza (faza platoa): Faza platoa je faza u kojoj je postignuta maksimalna razgradnja i u kojoj se izravnala krivulja biorazgradnje.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

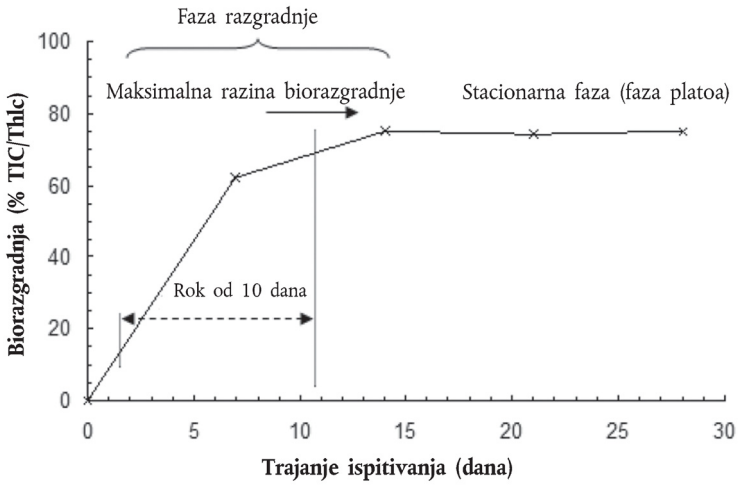
▼M4

Dodatak 2.

Primjer krivulje biorazgradnje

Slika 1.

Biorazgradnja 1-oktanola u ispitivanju CO_2 u plinskom prostoru



Pojmovnik

Biorazgradnja

Faza razgradnje

Maksimalna razina biorazgradnje

Stacionarna faza (faza platoa)

Rok od 10 dana

Trajanje ispitivanja (dana)

▼M4

C.30. BIOAKUMULACIJA U KOPNENIM OLIGOHETIMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 317 (2010). Od ispitnih metoda koje se odnose na sudbinu u okolišu, Biokoncentracija: Test s ribama u protočnom postupku (poglavlje C.13 ovog Priloga (49)) objavljena je 1996., a Bioakumulacija u bentičkim oligohetima iz sedimenta (53) objavljena je 2008. Ekstrapolacija podataka o vodenoj bioakumulaciji kod kopnenih organizama, poput gujavica, je teška, ako ne i nemoguća. Modeli izračuna utemeljenih na lipofilnosti ispitivane kemikalije, npr. (14) (37), trenutačno se koriste za procjenu bioakumulacije kemikalija u tlu, kao npr. u dokumentu EU-a o tehničkim smjernicama (19). Već je obrađena potreba za ispitnom metodom specifičnom za ovo područje, npr. (55). Takva je metoda poglavito važna za procjenu sekundarnog otrovanja u kopnenim prehrambenim lancima (4). Nekoliko se nacionalnih ispitinih metoda bavilo pitanjem bioakumulacije u drugim organizmima osim riba, npr. (2) i (72). Metodu mjerenja bioakumulacije iz onečišćenih tala u gujavicama (Eisenia fetida, Savigny) i crvima razvilo je Američko društvo za testiranje i materijale (*American Society for Testing and Materials*) (3). Međunarodno prihvaćena metoda za određivanje bioakumulacije u tlu obrađenom spikingom poboljšat će procjenu rizika kemikalija u kopnenim ekosustavima, npr. (25) (29).

2. Beskralježnjaci koji konzumiraju tlo izloženi su kemikalijama vezanim za tlo. Među tim životinjama kopneni oligoheti igraju važnu ulogu u strukturi i funkciji tala (15) (20). Kopneni oligoheti žive u tlu, a djelomice i na površini tla (poglavito u sloju legla); oni često predstavljaju vrstu koja najviše obiluje biomasom (54). Bioturbacijom tla te služenjem kao plijen, ove životinje mogu snažno utjecati na bioraspoloživost kemikalija drugim organizmima, poput beskralježnjaka (npr. grabežljivih grinja i kornjaša; npr. (64) ili kralježnjaka grabežljivaca (npr. lisica i galebova) (18) (62). Neke vrste kopnenih oligoheta koje se trenutačno koriste u ispitivanjima ekotoksičnosti opisane su u Dodatku 5.

3. Standardni vodič za provođenje laboratorijskog ispitivanja toksičnosti ili bioakumulacije tla Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests) s gujavicom Eisenia fetida i bijelim crvom Enchytraeus albidus (3) donosi brojne ključne i korisne pojedinosti za provedbu ove ispitne metode bioakumulacije u tlu. Daljnji dokumenti na koje se upućuje u ovoj ispitnoj metodi jesu poglavlje C.13 ovog Priloga, Biokoncentracija: Test s ribama u protočnom postupku (49) i OECD TG 315: Bioakumulacija u bentičkim oligohetima iz sedimenta (53). Praktična iskustva sa studijama o bioakumulaciji u tlu i publikacijama iz literature, npr. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), također su glavni izvori informacija za ovu ispitnu metodu.

4. Ova se ispitna metoda uglavnom može primijeniti na stabilne, neutralne organske kemikalije, koje naginju adsorpciji na tla. Ovom ispitnom metodom moguće je testiranje na bioakumulaciju stabilnih metaloorganskih spojeva koji se vežu za tlo. Također se može primijeniti i na metale i druge elemente u tragovima.

PREDUVJETI

5. Testovi za mjerenje bioakumulacije kemikalije u kopnenim oligohetima provođeni su s teškim metalima (vidjeti npr. (63)) i s postojanim, organskim kemikalijama niskih log Kow vrijednosti između 3,0 i 6,0, npr. (40). Takvi se testovi primjenjuju i na:

— Kemikalije s vrijednostima log K_{ow} većima od 6,0 (superhidrofobne kemikalije);

▼M4

— Kemikalije koje pripadaju razredu organskih kemikalija za koje je poznato da imaju bioakumulacijski potencijal u živim organizmima, npr. površinski aktivne ili jako adsorptivne kemikalije;

— Kemikalije koje naznačuju bioakumulacijski potencijal zbog strukturnih svojstava, npr. analogoni kemikalija s poznatim bioakumulacijskim potencijalom; i

— Metale.

6. Podaci o ispitivanoj kemikaliji, kao što su uobičajeni naziv, kemijski naziv (po mogućnosti IUPAC naziv), strukturna formula, CAS registarski broj, čistoća, mjere opreza, ispravni uvjeti skladištenja i analitičke metode trebaju se dobiti prije početka studije. Osim toga, trebaju biti poznati i sljedeći podaci:

(a) topljivost u vodi;

(b) podjelni koeficijent oktanol/voda, $K_{ow;}$

(c) podjelni koeficijent tlo/voda, izražen kao $K_{oc,}$

(d) tlak pare;

(e) razgradivost (npr. u tlu, vodi);

(f) poznati metaboliti.

7. Mogu se koristiti radioaktivno obilježene i radioaktivno neobilježene ispitivane kemikalije. Međutim, radi olakšavanja analize preporučuje se korištenje radioaktivno obilježenih ispitivanih kemikalija. Odluka o tomu donosi se na temelju otkrivanja ograničenja ili traženja mjerenja polazne ispitivane kemikalije i metabolita. Ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana kemikalija i mjere ukupni radioaktivni ostaci, važno je karakterizirati radioaktivno obilježene ostatke i u tlu i u ispitnim organizmima, i to po pitanju postotka polazne ispitivane kemikalije i radioaktivno obilježene nepolazne kemikalije, npr. u uzorcima uzetima u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije kako bi se omogućio izračun faktora bioakumulacije (BAF) za polaznu ispitivanu kemikaliju i predmetne metabolite tla (vidjeti stavak 50.). Možda će se ovdje opisana metoda morati izmijeniti kako bi se npr. omogućilo dovoljno biomase za mjerenje radioaktivno neobilježene organske ispitivane kemikalije ili metala. Kada se mjere ukupni radioaktivni ostaci (tekućinskim scintilacijskim brojenjem nakon ekstrakcije, izgaranja ili otapanja tkiva), faktor bioakumulacije temelji se na polaznoj ispitivanoj kemikaliji i metabolitima. Izračun BAF-a trebao bi se, po mogućnosti, temeljiti na koncentraciji polazne ispitivane kemikalije u organizmima i ukupnim radioaktivnim ostacima. Nakon toga iz BAF-a treba izračunati faktor akumulacije u biota tlu (BSAF), normaliziran na sadržaj lipida u crvu i sadržaj organskog ugljika (OC), radi usporedbe rezultata različitih ispitivanja bioakumulacije.

8. Trebala bi biti poznata toksičnost ispitivane kemikalije na vrste korištene u testu, npr. koncentracija s učinkom (ECx) ili smrtonosna koncentracija (LCx) za vrijeme trajanja faze apsorpcije (npr. (19)). Odabrana koncentracija ispitivane kemikalije trebala bi, po mogućnosti, iznositi oko 1 % njezina akutnog asimptotskog LC_{50} te biti najmanje desetostruko veća od svojih granica detekcije u tlu korištenom analitičkom metodom. Ako su dostupne, prednost treba dati vrijednostima toksičnosti dobivenima iz dugotrajnih studija o subletalnim konačnim učincima (51) (52). Ako takvi podaci nisu dostupni, test akutne toksičnosti dat će korisne informacije (vidjeti npr. (23)).

▼M4

9. Treba biti dostupna prikladna analitička metoda poznate točnosti, preciznosti i osjetljivosti na kvantifikaciju kemikalije u ispitnim otopinama, u tlu i u biološkom materijalu, zajedno s pojedinostima o pripremi i skladištenju uzoraka, kao i sigurnosno-tehničkim listovima za materijale. Također trebaju biti poznate i analitičke granice detekcije ispitivane tvari u tlu i u tkivu crva. Ako se koristi 14C obilježena ispitivana kemikalija, trebaju biti poznati specifična radioakitvnost (tj. Bq mol-1) i postotak radioaktivnosti povezan s nečistoćama. Specifična radioaktivnost ispitivane kemikalije treba biti dovoljno velika da olakša analizu, a upotrijebljene ispitne koncentracije ne smiju izazivati toksične učinke.

10. Ispitivanje se može provoditi s umjetnim tlom ili s prirodnim tlima. Prije početka ispitivanja trebaju biti poznati podaci o svojstvima korištenog prirodnog tla, npr. podrijetlo tla ili njegovih sastojaka, pH, sadržaj organskog ugljika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline) te vodni kapacitet (WHC) (3) (48).

NAČELO ISPITIVANJA

11. Parametri koji karakteriziraju bioakumulaciju ispitivane kemikalije obuhvaćaju i faktor bioakumulacije (BAF), konstantu brzine apsorpcije (k_s) i konstantu brzine eliminacije (k_e). Definicije su navedene u Dodatku 1.

12. Ispitivanje se sastoji od dviju faza: faze apsorpcije (faze izlaganja) i faze eliminacije (faze nakon izlaganja). Tijekom faze apsorpcije skupine crva u višestrukim određivanjima izlažu se tlu, koje je spikingom obrađeno ispitivanom kemikalijom. Osim ispitnih životinja, kontrolne skupine crva drže se u istim uvjetima, samo bez ispitivane kemikalije. Mjere se suha masa i sadržaj lipida ispitnih organizama. To se može učiniti i s crvima iz kontrolne skupine. Analitičke pozadinske vrijednosti (slijepe probe) mogu se dobiti analizom uzoraka kontrolnih crva i tla. Za fazu eliminacije crvi se prenose u tlo u kojemu nema ispitivane kemikalije. Faza eliminacije uvijek je potrebna, osim ako je apsorpcija ispitivane kemikalije bila neznatna tijekom faze izlaganja. Faza eliminacije donosi podatke o brzini kojom ispitni organizmi izlučuju ispitivanu kemikaliju (npr. (27)). Ako se tijekom faze apsorpcije ne postigne stabilno stanje, određivanje kinetičkih parametara - faktora kinetičke bioakumulacije BAFk, konstante brzine apsorpcije i eliminacije - u pravilu bi se trebalo temeljiti na istodobnom usklađivanju rezultata faze apsorpcije i faze eliminacije. Koncentracija ispitivane kemikalije u/na crvima prati se tijekom obje faze ispitivanja.

13. Tijekom faze apsorpcije mjerenja se vrše u vremenima uzorkovanja od 14 dana (enhitreji) ili od 21 dana (gujavice) sve dok se ne postigne stabilno stanje (11) (12) (67). Stabilno je stanje postignuto kad je grafički prikaz koncentracije u crvima u ovisnosti o vremenu paralelan s vremenskom osi te kada tri uzastopne analize koncentracije u uzorcima uzetima u vremenskim razmacima od najmanje dva dana ne variraju više od ± 20 % jedna od druge na temelju statističkih usporedbi (npr. analiza varijance, regresijska analiza).

14. Faza eliminacije sastoji se od prijenosa ispitnih organizama u posude koje sadržavaju isti supstrat, samo bez ispitivane kemikalije. Tijekom faze eliminacije mjerenja se vrše u vremenima uzorkovanja tijekom 14 dana (enhitreji) ili 21 dana (gujavice), osim ako prethodno analitičko određivanje nije pokazalo 90 % smanjenja ostataka ispitivane kemikalije u crvima. Koncentracija ispitivane kemikalije u crvima na kraju faze eliminacije prijavljuje se kao

▼M4

neeliminirani ostaci. Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAFss) računa se, po mogućnosti, i kao omjer koncentracije u crvima (Ca) i u tlu (Cs) u očito stabilnom stanju i kao faktor kinetičke bioakumulacije, BAFK, kao omjer konstante brzine apsorpcije iz tla (ks) i konstante brzine eliminacije (ke) (za definicije vidjeti Dodatak 1.), pod pretpostavkom kinetike prvog reda (za izračune vidjeti Dodatak 2.). Ako je očito da se ne može primijeniti kinetika prvog reda, treba se koristiti drugim modelima.

15. Konstanta brzine apsorpcije, konstanta (ili konstante kada su obuhvaćeni i drugi modeli) brzine eliminacije, faktor kinetičke bioakumulacije (BAFK) te, kad je moguće, granice pouzdanosti svih tih parametara izračunavaju se iz jednadžbi kompjutoriziranog modela (za smjernice vidjeti Dodatak 2.). Ispravnost usklađenosti bilo kojeg modela može se odrediti, npr. iz koeficijenta korelacije ili koeficijenta određivanja (koeficijenti blizu jedinice znak su dobre usklađenosti) ili hi-kvadratom. Isto tako, i veličina standardne pogreške ili granica pouzdanosti blizu procijenjenih parametara mogu biti znak ispravne usklađenosti modela.

16. Da bi se smanjila varijabilnost rezultata ispitivanja za ispitivane kemikalije visoke lipofilnosti, faktori bioakumulacije trebali bi se izražavati u odnosu na sadržaj lipida i sadržaj organskog ugljika (kg organskog ugljika u tlu (OC) kg-1 sadržaja lipida u crvima). Taj se pristup temelji na činjenici da za neke razrede kemikalija postoji jasna veza između bioakumulacijskog potencijala i lipofilnosti; to je dobro utvrđeno za ribe (47). Postoji veza između sadržaja lipida u ribama i bioakumulacije takvih kemikalija. Slične su korelacije pronađene i za bentičke organizme, npr. (30) (44). Slično tomu, ta je korelacija pokazana i za kopnene oligohete, npr. (5) (6) (7) (14). Ako je na raspolaganju dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida ispitnih životinja može se odrediti na istom biološkom materijalu koji se koristio za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije. Druga je mogućnost uporaba kontrolnih životinja za mjerenje sadržaja lipida.

VALJANOST ISPITIVANJA

17. Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji i za kontrolne i za ispitne posude:

— Na kraju ispitivanja ukupna smrtnost tijekom faze apsorpcije i faze eliminacije ne bi trebala biti veća od 10 % (gujavice) ili 20 % (enhitreji) od ukupnog broja uvedenih crva.

— Za *Eisenia fetida i Eisenia andrei* srednja vrijednost gubitka mase izmjerena na kraju faze apsorpcije i na kraju faze eliminacije ne bi trebala premašivati 20 % u usporedbi s početnom svježom masom (f.w.) na početku svake faze.

OPIS METODE

Ispitne vrste

18. Za ispitivanje bioakumulacije preporučuje se nekoliko vrsta kopnenih oligoheta. Najčešće korištene vrste *Eisenia fetida* ili *Eisenia andrei* (Lumbricidae), ili *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus,* ili *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) opisane su u Dodatku 5.

▼M4

Aparatura

19. Treba se pobrinuti da se izbjegava uporaba materijala, za sve dijelove opreme, koji se mogu otapati, adsorbirati ispitivanu kemikaliju ili propuštati druge kemikalije te onih koji imaju negativan učinak na ispitne životinje. Standardne pravokutne ili cilindrične posude, načinjene od kemijski inertnog materijala i prikladne zapremine, mogu se koristiti u skladu s brzinom punjenja, tj. brojem ispitnih crva. Plemeniti čelik, plastika ili staklo mogu se koristiti za svu opremu koja dolazi u doticaj s ispitnim medijem. Ispitne posude treba prikladno zatvoriti kako bi se izbjegao bijeg crva te ujedno omogućio dovoljan dotok zraka. Za kemikalije s visokim koeficijentima adsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, možda će biti potrebno silanizirano staklo. U tim će se situacijama oprema morati baciti nakon uporabe (49). Treba spriječiti izlazak radioaktivno obilježenih ispitivanih kemikalija i hlapljivih kemikalija. Treba koristiti zamke (npr. staklene posude za pranje plinova) koje sadržavaju odgovarajuće apsorbente kako bi se zadržali svi ostaci koji isparavaju iz ispitnih posuda.

Tlo

20. Kakvoća ispitnog tla treba omogućiti preživljavanje i, po mogućnosti, razmnožavanje ispitnih organizama za trajanja aklimatizacije i razdoblja ispitivanja, a da pritom oni ne pokazuju nikakvo neuobičajeno ponašanje ili izgled. Crvi bi trebali rovati u tlu.

21. Kao supstrat u ispitivanjima, preporučuje se uporaba umjetnog tla opisanog u poglavlju C.8 ovog Priloga (48). Priprema umjetnog tla za uporabu u ispitivanjima bioakumulacije te preporuke za skladištenje umjetnog tla nalaze se u Dodatku 4. Umjetno tlo sušeno na zraku može se skladištiti na sobnoj temperaturi do uporabe.

22. Međutim, prirodna tla s neonečišćenih mjesta mogu poslužiti kao ispitno tlo i/ili tlo za uzgoj kultura. Za prirodna tla treba biti svojstveno podrijetlo (mjesto skupljanja), pH, sadržaj organskog ugljika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), maksimalni vodni kapacitet (WHCmax) te postotak sadržaja vode. Analiza tla ili njegovih sastojaka na mikroonečišćivače prije uporabe trebala bi dati korisne informacije. Ako se koristi tlo s poljoprivrednog zemljišta, isto ne smije biti tretirano proizvodima za zaštitu usjeva niti balegom tretiranih životinja kao gnojivom najmanje godinu dana ranije, a organskim gnojivima najmanje šest mjeseci prije uzorkovanja (50). Postupci manipulacije prirodnih tala prije njihove uporabe u ispitivanjima ekotoksičnosti s oligohetima u laboratoriju opisani su u (3). Vrijeme skladištenja prirodnih tala u laboratoriju treba biti što je moguće kraće.

Primjena ispitivane kemikalije

23. Ispitna se kemikalija inkorporira u tlo. U obzir treba uzeti fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije. Ispitivana kemikalija topljiva u vodi treba se potpuno otopiti u vodi prije miješanja s tlom. Preporučeni postupak spikinga za ispitivane kemikalije slabo topljive u vodi obuhvaća premazivanje jednog ili većeg broja sastojaka (umjetnog) tla ispitivanom kemikalijom. Primjerice, kremeni pijesak ili njegov dio mogu se namočiti u otopini ispitivane kemikalije u prikladnom organskom otapalu, koji onda polako isparava dok ne ostavi suhi pijesak. Premazani dio potom se može umiješati u vlažno tlo. Glavna prednost ovog postupka jest ta da se u tlo ne uvodi otapalo. Kada se

▼M4

koristi prirodno tlo, ispitivana kemikalija može se dodati postupkom spikinga dijela tla sušenog na zraku na gore opisani način za umjetno tlo ili miješanjem ispitivane kemikalije u vlažno tlo, uz naknadnu fazu isparavanja ako se koristi otapajuće sredstvo. Općenito, što je moguće više treba izbjegavati doticaj vlažnog tla s otapalima. U obzir treba uzeti sljedeće (3):

— Ako se koristi neko drugo otapalo osim vode, ono treba biti mješljivo s vodom i/ili treba izići (primjerice, ispariti) i ostaviti samo ispitivanu kemikaliju na tlu.

— Ako se koristi kontrola s otapalom, nema potrebe za negativnom kontrolom. Kontrola s otapalom trebala bi sadržavati najvišu koncentraciju otapala koja se dodaju tlu i u njoj se treba koristiti otapalo iz iste šarže koja se koristila za radnu otopinu. Glavni kriteriji za odabir odgovarajućeg otapajućeg sredstva trebali bi biti toksičnost i hlapljivost otapala, topljivost ispitivane kemikalije u odabranom otapalu.

24. Za kemikalije koje su slabo topljive u vodi i u organskim otapalima 2,0 - 2,5 g fino usitnjenog kremenog pijeska po ispitnoj posudi može se pomiješati s količinom ispitivane kemikalije, npr. uporabom žbuke i tucanog pijeska, za dobivanje željene ispitne koncentracije. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije dodaje prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa s odgovarajućom količinom deionizirane vode da bi se dobio potrebni sadržaj vlage. Konačna se smjesa podijeli na ispitne posude. Taj se postupak ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a pripremi se također i prikladn akontrola s 2,0 - 2,5 g fino usitnjenog kremenog pijeska po ispitnoj posudi.

25. Koncentracija ispitivane kemikalije u tlu treba se odrediti nakon postupka spikinga. Homogena raspodjela ispitivane kemikalije u tlu treba se provjeriti prije uvođenja ispitnih organizama. Treba izvijestiti o metodi koja se koristila za spiking te o razlozima za odabir specifičnog postupka spikinga.

26. Između tla i faze porne vode, u idealnom slučaju, trebala bi se uspostaviti ravnoteža prije dodavanja organizama; preporučuje se vremensko razdoblje od četiri dana na 20 °C. Za mnoge organske kemikalije slabo topljive u vodi vrijeme potrebno za postizanje prave ravnoteže između adsorbiranih i otopljenih dijelova može biti nekoliko dana ili nekoliko mjeseci. Ovisno o cilju studije, primjerice kada treba oponašati uvjete u okolišu, tlo obrađeno postupkom spikinga može se ostaviti dulje vrijeme da „stari”, npr. za metale to su tri tjedna na 20 °C (22).

Uzgoj kulture ispitnih organizama

27. Crve, po mogućnosti, treba držati u trajnoj laboratorijskoj kulturi. Smjernice o metodama uzgoja laboratorijskih kultura za Eisenia fetida i Eisenia andrei te za vrstu Enchytraeidae navedene su u Dodatku 5. (vidjeti još i (48) (51) (52)).

28. Crvi koji se koriste u ispitivanju ne smiju imati zamjetnih bolesti, abnormalnosti i parazita.

PROVEDBA ISPITIVANJA

29. Ispitni organizmi izlažu se ispitivanoj kemikaliji tijekom faze apsorpcije. Faza apsorpcije treba trajati 14 dana (enhitreji) ili 21 dan (gujavice), osim ako se ne pokaže da je postignuto stabilno stanje.

▼M4

30. Za fazu eliminacije crvi se prenose u tlo u kojemu nema ispitivane kemikalije. Prvi uzorak treba uzeti 4 - 24 h nakon početka faze eliminacije. Primjeri rasporeda uzorkovanja za fazi apsorpcije od 21 dana i fazu eliminacije od 21 dana nalaze se u Dodatku 3.

Ispitni organizmi

31. Za mnoge vrste kopnenih enhitreja vrlo je mala pojedinačna masa (npr. 5-10 mg mokre mase po jedinci *Enchytraeus albidus*, a još manje za *Enchytraeus crypticus* ili *Enchytraeus luxuriosus*); da bi se provelo mjerenja mase i kemijska analiza, možda će biti neophodno pridružiti i crve iz ispitnih posuda za višestruka određivanja (tj. svi će se crvi iz posuda za višestruka određivanja iskoristiti za dobivanje jednog rezultata analize tkiva). 20 jedinki enhitreja dodaje se u posude za višestruka određivanja, a treba biti najmanje tri posude za višestruka određivanja. Ako je granica analitičke detekcije ispitivane kemikalije visoka, možda će biti potrebno još više crva. Za ispitne vrste veće pojedinačne mase (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei*) mogu se koristiti posude za višestruka određivanja koje sadržavaju samo jednu jedinku.

32. Gujavice koje se koriste u ispitivanju trebale bi biti slične mase (npr. *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* trebale bi imati pojedinačnu masu od 250 – 600 mg). Enhitreji (npr. *Enchytraeus albidus*) trebaju biti dugački otprilike 1 cm. Svi crvi koji se koriste u određenom ispitivanju trebaju dolaziti iz istog izvora i to trebaju biti odrasle životinje s pojasom žljezdanog epitela (klitelum) (vidjeti Dodatak 5.). Budući da masa i starost životinja mogu utjecati na vrijednosti BAF-a (npr. zbog varirajućeg sadržaja lipida i/ili prisustva jajašaca), te parametre treba točno zabilježiti i u obzir uzeti pri tumačenju rezultata. Osim toga, kokoni se mogu polagati i tijekom razdoblja izlaganja, što će također imati utjecaja na vrijednosti BAF-a. Preporučuje se da se poduzorak ispitnih crva izvaže prije ispitivanja kako bi se procijenila srednja vrijednost mokre i suhe mase.

33. Treba koristiti visoki omjer tla i crva da bi se na minimum sveo pad koncentracije ispitivane kemikalije u tlu tijekom faze apsorpcije. Za vrste *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* preporučuje se minimalna količina od 50 g suhe mase (d.w.) tla po crvu, a za enhitreje minimalno 10-20 g d.w. tla po ispitnoj posudi. Posude trebaju sadržavati sloj tla debljine 2-3 cm (enhitreji) ili 4-5 cm (gujavice).

34. Crvi koji se koriste u ispitivanju vade se iz kulture (npr. enhitreji pomoću draguljarske pincete). Odrasle se životinje prenose u neobrađeno ispitno tlo radi aklimatizacije i hrane se (vidjeti stavak 36.). Ako se uvjeti ispitivanja razlikuju od uvjeta uzgoja kulture, faza aklimatizacije od 24-72 h trebala bi biti dovoljna da se crvi prilagode uvjetima ispitivanja. Nakon aklimatizacije gujavice se ispiru prenošenjem u staklene posude (npr. petri zdjelice) koje sadržavaju čistu vodu te se naknadno važu prije nego što se dodaju ispitnom tlu. Prije vaganja iz crva treba odstraniti višak vode blagim pritiskanjem crva o stijenku posude ili pažljivim tapkanjem crva blago navlaženim papirnatim ručnikom.

35. Treba promatrati i bilježiti ponašanje ispitnih organizama pri rovanju. U ispitivanjima s gujavicama te životinje (kontrolne i ispitne) obično rovare u tlu u roku od par sati; to treba provjeriti najkasnije 24 h nakon dodavanja crva u ispitne posude. Ako gujavice ne rovu u tlu (npr. više od 10 % tijekom više od polovice trajanja faze apsorpcije), to je znak da ili uvjeti ispitivanja nisu prikladni ili ispitni organizmi nisu zdravi. U takvim bi se slučajevima

▼M4

ispitivanje trebalo prekinuti i ponoviti. Enhitreji uglavnom žive u međuprostornim porama tla pa je moguće da je njihova koža samo djelomice u doticaju sa supstratom koji je okružuje; pretpostavlja se da je jednako izlaganje enhitreja koji rovu i onih koji ne rovu te da izostanak rovanja kod enhitreja ne mora nužno značiti i potrebu za ponavljanjem ispitivanja.

Hranjenje

36. Hranjenje treba planirati kad se koristi tlo s niskim sadržajem organskog ugljika. Kad se koristi umjetno tlo, za gujavice se preporučuje tjedna brzina hranjenja (tj. crve treba hraniti jedanput tjedno) od 7 mg suhog gnojiva na g suhe mase tla, a za enhitreje preporučuje se tjedna brzina od 2-2,5 mg usitnjenih zobenih pahuljica na g suhe mase tla (11). Prva porcija hrane treba se izmiješati s tlom neposredno prije dodavanja ispitnih organizama. Po mogućnosti treba koristiti istu vrstu hrane kao i u uzgoju kultura (vidjeti Dodatak 5.).

Svjetlo i temperatura

37. Ispitivanja treba provoditi u kontroliranom ciklusu svjetla i mraka od 16/8 sati, po mogućnosti 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda (3). Ispitna temperatura cijelo vrijeme trajanja ispitivanja treba iznositi 20 ± 2 °C.

Ispitne koncentracije

38. Koristi se samo jedna koncentracija. Treba obrazložiti situacije u kojima je/su potrebna(-e) dodatna(-e) koncentracija(-e). Ako je toksičnost (ECx) ispitivane kemikalije blizu granice analitičke detekcije, preporučuje se uporaba radioaktivno obilježene ispitivane kemikalije visoke specifične radioaktivnosti. Za metale bi koncentracija trebala biti viša od razine u tkivu i tlu.

Višestruka određivanja

39. Za kinetička mjerenja (fazu apsorpcije i fazu eliminacije) minimalni broj ispitnih posuda višestrukog određivanja treba biti tri po mjestu uzorkovanja. Ukupni broj pripremljenih posuda višestrukog određivanja treba biti dovoljan da obuhvati sva vremena uzorkovanja tijekom faze apsorpcije i faze eliminacije.

40. Za biološka promatranja i mjerenja (npr. omjer suhe i mokre mase, sadržaj lipida) te za analizu pozadinskih koncentracija u crvima i u tlu treba osigurati najmanje 12 posuda za višestruko određivanje iz negativne kontrole (četiri se uzorkuju na početku, četiri na kraju apsorpcije i četiri na kraju eliminacije) ako se ne koristi nikakvo drugo otapalo osim vode. Ako se za primjenu ispitivane kemikalije koristi otapajuće sredstvo, paralelno s ispitinim posudama za višestruko određivanje treba provoditi i ispitivanje kontrolnih posuda s otapalom (četiri posude za višestruko određivanje uzorkuju se na početku, četiri na kraju faze apsorpcije i četiri na kraju faze eliminacije) koje sadržavaju sve sastojke osim ispitivane kemikalije. U tom slučaju mogu se pripremiti i četiri dodatne posude za višestruko određivanje iz negativne kontrole (bez otapala) za fakultativno uzorkovanje na kraju faze apsorpcije. Te posude za višestruko određivanje mogu se biološki usporediti s kontrolama s otapalom da bi se dobile informacije o mogućem utjecaju otapala na ispitne organizme. Preporučuje se da se pripremi dovoljan broj dodatnih posuda za višestruko određivanje (npr. osam) za ispitne i kontrolnu/kontrolne posude.

▼M4

Učestalost mjerenja kakvoće tla

41. pH tla, sadržaj vlage u tlu i temperatura (neprekidno) u ispitnoj prostoriji trebaju se mjeriti na početku i na kraju faze apsorpcije i faze eliminacije. Jedanput tjedno treba prekontrolirati sadržaj vlage u tlu vaganjem ispitnih posuda i usporedbom stvarnih masa s početnim masama na početku ispitivanja. Gubitke vode treba kompenzirati dodavanjem deionizirane vode.

Uzorkovanje i analiza crva i tla

42. Primjer rasporeda faze apsorpcije i faze eliminacije u ispitivanjima bioakumulacije kod gujavica i enhitreja naveden je u Dodatku 3.

43. Tlo se uzorkuje iz ispitnih posuda za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije prije umetanja crva te tijekom faze apsorpcije i faze eliminacije. Tijekom ispitivanja određuju se koncentracije ispitivane kemikalije u crvima i u tlu. Općenito, mjere se ukupne koncentracije u tlu. Kao druga mogućnost, mogu se mjeriti koncentracije i u pornoj vodi; u takvom slučaju treba navesti obrazloženje i metode prije započinjanja studije te ih treba obuhvatiti u izvješću.

44. Crvi i tlo uzorkuju se najmanje u šest prigoda tijekom faze apsorpcije i faze eliminacije. Ako se pokazala stabilnost ispitivane kemikalije, može se smanjiti broj analiza tla. Preporučuje se da se analiziraju najmanje tri posude iz višestrukih određivanja na početku i na kraju faze apsorpcije. Ako koncentracija izmjerena na kraju faze apsorpcije odstupa od početne koncentracije za više od 30 %, treba analizirati i uzorke tla koji su se uzeli drugih dana.

45. U svakom trenutku uzorkovanja ukloniti crve iz tla predmetne posude za višestruko određivanje (npr. rasuti tlo iz posude za višestruko određivanje na pliticu i izvaditi crve mekanom draguljarskom pincetom), brzo ih isprati vodom u plitkoj staklenoj ili čeličnoj posudi. Ukloniti višak vode (vidjeti stavak 34.). Pažljivo prenijeti crve u prethodno izvaganu posudu, smjesta ih izvagati, uključujući i sadržaj crijeva.

46. Gujavice (*Eisenia sp*.) treba potom pustiti da isprazne crijeva tijekom noći, npr. na vlažnom filtarskom papiru u zatvorenoj petri zdjelici (vidjeti stavak 34.). Nakon pražnjenja crijeva treba odrediti masu crva kako bi se procijenio eventualno pad biomase tijekom ispitivanja (vidjeti validacijske kriterije u stavku 17.). Vaganje i analiza tkiva enhitreja provode se bez pražnjenja crijeva jer je to tehnički teško izvedivo zbog male veličine tih crva. Nakon konačnog određivanja mase crve treba odmah usmrtiti, i to najprikladnijom metodom (npr. pomoću tekućeg dušika ili njihovim zamrzavanjem na temperaturama ispod -18 °C).

47. Tijekom faze eliminacije crvi zamjenjuju onečišćeni sadržaj crijeva čistim tlom. To znači da mjerenja crva koji nisu ispraznili crijeva (u ovom kontekstu enhitreja) uzorkovanih neposredno prije faze eliminacije uključuje i onečišćeno tlo iz crijeva. Za vodene oligohete pretpostavlja se da se, nakon početnih 4 – 24 h faze eliminacije, većina onečišćenog sadržaja crijeva zamijeni čistim sedimentom, npr. (46). Do sličnih spoznaja se došlo i za gujavice u studijama akumulacije radioaktivno obilježenih kadmija i cinka (78). U enhitrejima koji nisu ispraznili crijeva koncentracija prvog uzorka faze eliminacije može se uzeti u obzir kao koncentracija u tkivu nakon pražnjenja crijeva. Kako bi se u obzir uzelo i razrjeđivanje koncentracije ispitivane kemikalije u neonečišćenom tlu tijekom faze eliminacije, masa sadržaja crijeva može se procijeniti iz omjera mokre mase crva/mase praha crva ili iz suhe mase crva/mase praha crva.

▼M4

48. Uzorke tla i crva treba, po mogućnosti, analizirati neposredno nakon njihova vađenja (tj. u roku od 1-2 dana) kako bi se spriječila razgradnja ili drugi gubici, a preporučuje se i izračun približnih brzina apsorpcije i eliminacije tijekom nastavka ispitivanja. Ako se analiza odgodi, uzorke treba uskladištiti prikladnom metodom, npr. dubokim smrzavanjem (≤ -18 °C).

49. Treba provjeriti jesu li za određenu metodu zadovoljavajuće preciznost i mjerna obnovljivost kemijske analize, kao i vraćanje ispitivane kemikalije iz uzoraka tla i crva; treba izvijestiti i o učinkovitosti ekstrakcije, granici detekcije (LOD) i granici kvantifikacije (LOQ). Slično tomu, treba provjeriti može li se ispitivana kemikalija detektirati u kontrolnim posudama u koncentracijama višima od pozadinske. Kad je koncentracija ispitivane kemikalije u pokusnom organizmu Ca > 0 u kontrolnim crvima, to treba uzeti u obzir pri izračunu kinetičkih parametara (vidjeti Dodatak 2.). Sa svim uzorcima treba tijekom ispitivanja postupati tako da se na minimum svedu onečišćenja i gubici (npr. nastali kao rezultat adsorpcije ispitivane kemikalije na uređaj za uzorkovanje).

50. Pri radu s radioaktivno obilježeimn ispitnim kemikalijama moguće je analizirati i polazne kemikalije i njihove metabolite. Korisne informacije donosi kvantifikacija polazne ispitivane kemikalije i metabolita u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije. Potom bi uzorke trebalo „očistiti” kako bi se polazna ispitivana kemikalija mogla zasebno kvantitativno odrediti. Ako pojedinačni metaboliti premašuju 10 % ukupne radioaktivnosti u analiziranom(-im) uzorku(-cima), preporučuje se identifikacija tih metabolita.

51. Treba zabilježiti i u izvješće uključiti i ukupni oporavak te oporavak ispitivane kemikalije u crvima, tlu te, ako se koriste, u zamkama koje sadržavaju apsorbente radi zadržavanja isparene ispitivane kemikalije.

52. Spajanje jedinki uzorkovanih iz određene ispitne posude prihvatljivo je za crve enhitreja koji su manji od gujavica. Ako spajanje obuhvaća smanjenje broja posuda za višestruko određivanje, to ograničava statistički postupak koji se može primijeniti na podatke. Ako se traže specifični statistički postupak i snaga, u ispitivanje treba uključiti odgovarajući broj posuda za višekratno određivanje kako bi se omogućilo željeno spajanje, postupak i snaga.

53. Preporučuje se da se BAF izražava i kao funkcija ukupne suhe mase i, kad je to potrebno (tj. za jako hidrofobne kemikalije), kao funkcija sadržaja lipida. Treba koristiti prikladne metode za određivanje sadržaja lipida (neke postojeće metode, npr. (31) (58), treba prilagoditi u tu svrhu). U tim se metodama koristi tehnika ekstrakcije klorofora/metanola. Međutim, radi izbjegavanja uporabe kloriranih otapala, treba koristiti izmijenjenu metodu Bligha i Dyera (9) kao što je opisano u (17). Budući da razne metode možda neće dati identične vrijednosti, vrlo je važno navesti pojedinosti korištene metode. Kad je to moguće, tj. ako postoji dovoljno tkiva crva, analizu lipida treba, po mogućnosti, provoditi na istom uzorku ili ekstraktu kao i u analizi ispitivane kemikalije jer se lipidi često moraju ukloniti iz ekstrakta prije nego što se on može kromatografski analizirati (49). Druga je mogućnost da se upotrijebe kontrolne životinje za mjerenje sadržaja lipida, što se potom može iskoristiti za normalizaciju vrijednosti BAF-a. Tim se potonjim pristupom umanjuje onečišćenost opreme ispitivanom kemikalijom.

▼M4

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

54. Krivulja apsorpcije ispitivane kemikalije dobiva se grafičkim prikazom koncentracije u/na crvima tijekom faze apsorpcije u ovisnosti o vremenu na aritmetičkoj ljestvici. Kada krivulja dosegne plato ili stabilno stanje (vidjeti definicije u Dodatku 1.), faktor bioakumulacije stabilnog stanja BAFss izračunava se iz:

$$\frac{C_a \text{ u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije (srednja vrijednost)}}{C_s \text{ stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije (srednja vrijednost)}}$$

C_a je koncentracija ispitivane kemikalije u pokusnom organizmu

C_s je koncentracija ispitivane kemikalije u tlu

55. Ako se ne postigne stabilno stanje, umjesto BAFss treba odrediti BAFK, na temelju konstanti brzine, i to na sljedeći način:

— Odrediti faktor akumulacije (BAF_K) kao omjer k_s/k_e.

— Brzina apsorpcije i brzina eliminacije se, po mogućnosti, izračunavaju istodobno (vidjeti jednadžbu 11. u Dodatku 2.).

— Konstanta brzine eliminacije (k_e) obično se određuje iz krivulje eliminacije (tj. grafičkog prikaza koncentracije ispitivane tvari u crvima tijekom faze eliminacije). Konstanta brzine apsorpcije k_s izračunava se potom na temelju vrijednosti k_e i C_a koje se dobiju iz krivulje apsorpcije – za opis tih metoda vidjeti Dodatak 2. Za dobivanje BAF_K i konstanti brzine, k_s, i k_e, prednost se daje metodama uporabe procjene nelinearnih parametara na računalu. Ako eliminacija nije očito prvog reda, treba primijeniti kompleksnije modele.

Izvješće o ispitivanju

56. Izvješće o ispitivanju treba obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija:

— svi dostupni podaci o akutnoj ili dugotrajnoj toksičnosti (npr. EC_x, LC_x" NOEC) ispitivane kemikalije na oligohete iz tla;

— čistoća, fizikalna narav i fizikalno-kemijska svojstva, npr. log K_{ow}, topljivost u vodi;

— podaci za identifikaciju kemikalije, izvor ispitivane tvari, identitet i koncentracija upotrijebljenog otapala;

— ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana kemikalija, precizan položaj obilježenih atoma, specifična radioaktivnost i radioaktivno kemijska čistoća.

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, soj, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, starost, red veličina itd.

▼M4

Uvjeti ispitivanja:

— primijenjeni postupak ispitivanja;

— vrsta i svojstva korištene rasvjete i fotoperiod/fotoperiodi;

— plan ispitivanja npr. broj i veličina ispitnih posuda, masa tla i visina sloja tla, broj posuda za višestruko određivanje, broj crva u svakoj posudi za višestruko određivanje, broj ispitnih koncentracija, trajanje faze apsorpcije i faze eliminacije, učestalost uzorkovanja);

— obrazloženje odabira materijala ispitne posude;

— metoda pripreme i primjene ispitivane tvari, kao i obrazloženje odabira specifične metode;

— nazivne ispitne koncentracije, srednje vrijednosti izmjerenih vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su dobivene te vrijednosti;

— izvor sastojaka umjetnog tla ili – ako se koriste prirodni mediji – podrijetlo tla, opis svake prethodne obrade, rezultati iz kontrola (preživljavanje, razvoj biomase, razmnožavanje), svojstva tla (pH, sadržaj ukupnog organskog ugljika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), WHC_{max}, postotak sadržaja vode na početku i na kraju ispitivanja i sva ostala provedena mjerenja);

— detaljni podaci o obradi uzoraka tla i crva, uključujući i pojedinosti o pripremi, skladištenju, postupcima spikinga, ekstrakciji i analitičkim postupcima (i preciznosti) za ispitivanu tvar u crvima i u tlu, te sadržaj lipida (ako je izmjeren) i oporavak ispitivane tvari.

Rezultati:

— smrtnost crva iz kontrola i crva u svakoj ispitnoj posudi te svako opaženo neuobičajeno ponašanje (npr. izbjegavanje tla, nedostatak razmnožavanja u ispitivanjima bioakumulacije s enhitrejima);

— omjer suhe mase i mokre mase tla i pokusnih organizama (korisno za normalizaciju);

— mokra masa crva u svakom trenutku uzorkovanja; za gujavice mokra masa na početku ispitivanja i u svakom trenutku uzorkovanja prije i poslije pražnjenja crijeva;

— sadržaj lipida pokusnih organzama (ako je određen);

— krivulje koje pokazuju kinetiku apsorpcije i eliminacije ispitivane kemikalije u crva i vrijeme do stabilnog stanja;

— C_a i C_s (sa standardnom devijacijom i rasponom, ako je to primjereno) za sve trenutke uzorkovanja (C_a izraženo u g kg^{-1} mokre i suhe mase cijelog tijela, C_s izražen u g kg^{-1} mokre i suhe mase tla). Ako se traži i faktor bioakumulacije biota tla (BSAF) (npr. radi usporedbe rezultata dvaju ili većeg broja ispitivanja provedenih sa životinjama različitog sadržaja lipida), dodatno se može izraziti C_a kao g kg^{-1} sadržaja lipida u organizmu, a C_s se može izraziti kao g kg^{-1} organskog ugljika (OC) u tlu;

— BAF (izražen u kg tla·kg^{-1} crva), konstanta brzine apsorpcije tla k_s (izražena u g tla kg^{-1} crva na dan^{-1}) i konstanta brzine eliminacije k_e (izražena u $dana^{-1}$); BSAF (izražen u kg tla OC kg^{-1} sadržaja lipida u crvima) može se prijaviti naknadno;

▼M4

— ako su mjereni: postoci polazne kemikalije, metaboliti i vezani ostaci (tj. postotak ispitivane kemikalije koja se ne može ekstrahirati uobičajenim metodama ekstrakcije) detektirani u tlu i pokusnim životinjama;

— metode korištene za statističke analize podataka.

Vrednovanje rezultata:

— sukladnost rezultata s validacijskim kriterijima navedenima u stavku 17.;

— neočekivani ili neobični rezultati, npr. nepotpuna eliminacija ispitivane kemikalije iz pokusnih životinja.

LITERATURA

1. Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2. ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3. ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: str. 26.

4. Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

5. Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

6. Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

7. Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

8. Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

9. Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

10. Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Pariz, str. 671.

11. Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12. Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

13. Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

14. Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

15. Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

16. Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, str. 555-576.

17. De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18. Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

19. Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i Direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ, SL L 396, 30.12.2006., str. 1.

20. Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, str. 426.

21. OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Pariz

22. Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: str. 149. Može se preuzeti s interneta na adresi: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23. Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: str. 57.

24. Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25. EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

26. Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

27. Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

28. Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

29. Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

30. Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

31. Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

32. Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

33. Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

34. Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

35. ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36. Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

37. Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

38. Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

39. Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

40. Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

41. Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

42. Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

43. Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, str. 137.

44. Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

45. Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

46. Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼**M4**

47. Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48. Poglavlje C.8 ovog Priloga, Toksičnost za gujavice

49. Poglavlje C.13 ovog Priloga, Biokoncentracija: test protočnosti na ribama.

50. Poglavlje C.21 ovog Priloga, Mikroorganizmi iz tla: test transformacije dušika.

51. OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Pariz.

52. Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Pariz.

53. OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Pariz.

54. Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

55. Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

56. Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

57. Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58. Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

59. Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60. Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: str. 373.

61. Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

62. Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

63. Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

64. Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

65. Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93-100.

▼M4

66. Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67. Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.

68. Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

69. Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

70. Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

71. UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72. US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73. Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

74. Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75. Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

76. Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

77. Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

78. Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

79. Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Bioakumulacija je porast koncentracije ispitivane kemikalije u ili na organizmu u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije u mediju koji je okružuje. Bioakumulacija nastaje i iz procesa biokoncentracije i iz procesa biomagnifikacije (vidjeti u nastavku teksta).

Biokoncentracija je porast koncentracije ispitivane kemikalije u ili na organizmu, koja nastaje kao rezultat apsorpcije kemikalije isključivo iz medija koji je okružuje (tj. putem tjelesne površine i konzumiranog tla), u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije u mediju koji je okružuje.

Biomagnifikacija je porast koncentracije ispitivane kemikalije u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao rezultat apsorpcije iz onečišćene hrane ili plijena, u odnosu na koncentraciju ispitivane kemikalije u hrani ili plijenu. Biomagnifikacija može dovesti do prijenosa akumulacije ispitivane tvari unutar mreža hrane.

Eliminacija ispitivane kemikalije je gubitak te kemikalije iz tkiva pokusnog organizma aktivnim ili pasivnim procesima koji se odvijaju neovisno o prisustvu ili odsustvu ispitivane tvari u mediju koji je okružuje.

Faktor bioakumulacije (BAF) u bilo kojem trenutku tijekom faze apsorpcije ovog ispitivanja bioakumulacije je koncentracija ispitivane kemikalije u/na pokusnom organizmu (C_a u $g \cdot kg^{-1}$ suhe mase crva) podijeljena s koncentracijom te kemikalije u mediju koji je okružuje (C_s kao $g \cdot kg^{-1}$ suhe mase tla); jedinica za BAF je kg tla$\cdot kg^{-1}$ crva.

Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAF_{ss}) je BAF u stabilnom stanju i ne mijenja se značajno tijekom duljeg razdoblja, a koncentracija ispitivane kemikalije u mediju koji je okružuje (C_s kao $g.kg^{-1}$ suhe mase tla) konstantna je tijekom tog razdoblja.

Faktori bioakumulacije izračunati izravno iz omjera konstante brzine apsorpcije tla i konstante brzine eliminacije tla (k_s i k_e, vidjeti u nastavku teksta) nazivaju se faktorom kinetičke bioakumulacije (BAF_K).

Faktor akumulacije biota tla (BSAF) je koncentracija ispitivane kemikalije u/na pokusnom organizmu, normalizirana lipidima, podijeljena s koncentracijom ispitivane kemikalije u tlu, normaliziranom organskim ugljikom, u stabilnom stanju. Tada se C_a izražava kao $g \cdot kg^{-1}$ sadržaja lipida organizma, a C_s kao $g \cdot kg^{-1}$ sadržaja organskog ugljika tla; jedinica za BSAF je kg OC$\cdot kg^{-1}$ lipida.

Plato ili **stabilno stanje** definira se kao uravnoteženje između procesa apsorpcije i eliminacije koji se odvijaju istodobno tijekom faze izlaganja. Stabilno se stanje postiže na grafičkom prikazu BAF-a u ovisnosti o vremenu kada krivulja postane paralelna s vremenskom osi i kad se rezultati tri uzastopne analize BAF-a provedene na uzorcima koji se uzimaju u razmacima od najmanje dva dana nalaze unutar 20 % jedni od drugih te kad ne postoje statistički značajne razlike među trima razdobljima uzorkovanja. Za ispitivane kemikalije koje se sporo apsorbiraju prikladniji bi vremenski razmak bio sedam dana (49).

Podjelni koeficijent organski ugljik-voda (K_{oc}) je omjer koncentracije kemikalije u/na dijelu tla s organskim ugljikom i koncentracije kemikalije u vodi u ravnoteži.

Podjelni koeficijent oktanol-voda (K_{ow}) je omjer topljivosti kemikalije u n-oktanolu i vodi u ravnoteži, ponekad se izražava i kao P_{ow}. Logaritam K_{ow} ($\log K_{ow}$) koristi se kao znak bioakumulacijskog potencijala kemikalije kod vodenih organizama.

▼**M4**

Faza apsorpcije ili izlaganja je vrijeme tijekom kojega pokusni organizmi bivaju izloženi ispitivanoj kemikaliji.

Konstanta brzine apsorpcije tla (k_s) je brojčana vrijednost koja definira brzinu porasta koncentracije ispitivane tvari u/na pokusnom organizmu, a koja nastaje kao rezultat apsorpcije iz faze tla. k_s se izražava kao g tla kg^{-1} crva d^{-1}.

Faza eliminacije je vrijeme, nakon prijenosa pokusnih organizama iz onečišćenog medija u medij bez ispitivane tvari, tijekom kojega se proučava eliminacija (ili neto gubitak) kemikalije iz pokusnih organizama.

Konstanta brzine eliminacije (k_e) je brojčana vrijednost koja definira brzinu opadanja koncentracije ispitivane tvari u/na pokusnim organizmima, nakon prijenosa pokusnih organizama iz medija koji sadržava ispitivanu tvar u medij bez te kemikalije; k_e se izražava u d^{-1}.

Ispitivana kemikalija: Sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom Ispitnom metodom.

▼M4

Dodatak 2.

Izračun parametara apsorpcije i eliminacije

Osnovni konačni učinak ispitivanja bioakumulacije je faktor bioakumulacije, BAF. Izmjereni BAF može se izračunati dijeljenjem koncentracije u pokusnom organizmu, C_a, a koncentracijom u tlu, C_s, u stabilnom stanju. Ako se stabilno stanje ne postigne tijekom faze apsorpcije, BAF_K se, umjesto BAFss, izračunava iz konstanti brzine. Međutim, ipak treba primijetiti temelji li se BAF na koncentracijama u stabilnom stanju ili ne.

Najčešći način dobivanja faktora kinetičke bioakumulacije (BAF_K), konstante brzine apsorpcije tla (k_s) i konstante brzine eliminacije (k_e) jest uporaba metoda procjene nelinearnih parametara na računalu, npr., na temelju modela opisanih u (68). Kad je zadan niz podataka o koncentracijama u sekvencijalnim vremenima i modeli jednadžbi:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[jednadžba 1]}$$

ili

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[jednadžba 2]}$$

gdje je

C_a = koncentracija kemikalije u crvima [g kg-1 mokre ili suhe mase]

k_s = konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g tla kg-1 crva d-1]

C_s = koncentracija kemikalije u tlu [g kg-1 mokre ili suhe mase]

k_e = konstanta brzine eliminacije [d-1]

t_c = vrijeme na kraju faze apsorpcije,

ti računalni programi izračunavaju vrijednosti BAF_K, k_s i k_e.

Kad se pozadinska koncentracija u neizloženim crvima, npr. na dan 0, značajno razlikuje od nule (to može biti slučaj, npr. za metale), pozadinsku koncentraciju ($C_{a,0}$) treba obuhvatiti tim jednadžbama pa bi one glasile:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[jednadžba 3]}$$

i

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[jednadžba 4]}$$

U slučajevima kad se opazi značajan pad koncentracije ispitivane kemikalije u tlu tijekom razdoblja trajanja faze apsorpcije, mogu se primijeniti sljedeći modeli, npr. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k0^{t}}) \qquad \text{[jednadžba 5]}$$

▼M4

gdje je

C_s = koncentracija kemikalije u tlu [g kg-1 mokre ili suhe mase]

k_0 = konstanta brzine razgradnje u tlu [d-1]

C_0 = početna koncentracija kemikalije u tlu [g kg-1 mokre ili suhe mase]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[jednadžba 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[jednadžba 7]}$$

gdje je

C_a = koncentracija kemikalije u crvima [g kg-1 mokre ili suhe mase]

k_s = konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g tla kg-1 crva d-1]

k_0 = konstanta brzine razgradnje u tlu [d-1]

k_e = konstanta brzine eliminacije [d-1]

t_c = vrijeme na kraju faze apsorpcije.

Kad se tijekom faze apsorpcije postigne stabilno stanje (tj. $t = \infty$), jednadžba 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[jednadžba 1]}$$

može se skratiti na:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ili

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[jednadžba 8]}$$

Tada je k_s/k_e x C_s pristup koncentraciji ispitivane tvari u tkivu crva u stabilnom stanju ($C_{a,ss}$).

Faktor akumulacije biota tla (BSAF) može se izračunati na sljedeći način:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[jednadžba 9]}$$

gdje je f_{oc} udio organskog ugljika u tlu, a f_{lip} udio lipida u crvu, a obje te vrijednosti, po mogućnosti, se određuju na uzorcima uzetima iz ispitivanja, a temelje se jedna na suhoj masi, a druga na mokroj masi.

Može se izraditi model kinetike eliminacije pomoću podataka iz faze eliminacije te primjenom sljedećeg modela jednadžbe i računalno utemeljene metode procjene nelinearnih parametara. Ako podaci na grafičkom prikazu u ovisnosti o vremenu naznačuju konstantni eksponencijalni pad koncentracije ispitivane tvari u životinjama, model s jednim odjelom (jednadžba 9) može se upotrijebiti za opis trajanja eliminacije.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[jednadžba 10]}$$

▼M4

Ponekad se čini da su procesi eliminacije dvofazni i da u njima dolazi do rapidnog pada C_a tijekom početnih faza, a to se pretvara u sporiji gubitak ispitivanih tvari u kasnijim fazama eliminacije, npr. (27) (68). Te se dvije faze mogu protumačiti pretpstavkom da u organizmu postoje dva odjela iz kojih se gubi ispitivana kemikalija, i to različitom brzinom. U tim bi slučajevima trebalo proučiti specifičnu literaturu, npr. (38) (39) (40) (78).

Putem gore navedenog modela jednadžbe mogu se u istom ispitivanju izračunati i kinetički parametri (k_s i k_e) primjenom kinetičkog modela prvog reda istodobno na sve podatke, kako iz faze apsorpcije tako i iz faze eliminacije. Za opis metode koja bi omogućila takav kombinirani izračun konstanti brzine apsorpcije i eliminacije mogu se konzultirati reference (181), (213) i (210).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[jednadžba 11]}$$

Napomena: Kad se istodobno procjenjuju parametri apsorpcije i eliminacije iz kombiniranih podataka o apsorpciji i eliminaciji, „m” iz jednadžbe 11 je deskriptor koji računalnom programu omogućuje da dodijeli podpojmove jednadžbe nizovima podataka iz odgovarajuće faze te da se vrednovanje propisno provede (m = 1 za fazu apsorpcije; m = 2 za fazu eliminacije).

Unatoč tomu, ove modele jednadžbi treba koristiti s oprezom, poglavito kada tijekom ispitivanja dođe do promjena bioraspoloživosti ili (bio)razgradnje ispitivane kemikalije (vidjeti npr. (79)).

▼M4

Dodatak 3.

PRIMJERI PLANOVA ISPITIVANJA BIOAKUMULACIJE TLA

Ispitivanje s gujavicama

(a) Faza apsorpcije s osam datuma uzorkovanja korištenih za izračun kinetike

Dan	Djelatnost
– 6	Kondicioniranje pripremljenog tla 48 h;
– 4	Obrada dijela tla spikingom s otopinom ispitivane kemikalije; isparavanje eventualnih otapala; miješanje sastojaka tla; raspodjela tla u ispitne posude; uravnoteženje u uvjetima ispitivanja četiri dana (tri tjedna za tlo obrađeno spikingom s metalima);
– 3 do – 1	Vađenje pokusnih organizama iz uzgojene kulture radi aklimatizacije; priprema i vlaženje sastojaka tla;
0	Mjerenje temperature i pH tla; vađenje uzoraka tla iz ispitnih posuda i kontrola s otapalom radi određivanja koncentracije ispitivane kemikalije; dodavanje porcije hrane; vaganje i nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude; zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva za određivanje analitičkih pozadinskih vrijednosti, mokre i suhe mase te sadržaja lipida; vaganje svih ispitnih posuda radi kontrole vlažnosti tla; kontrola dovoda zraka ako se koristi zatvoreni sustav ispitivanja;
1	Kontrola dovoda zraka, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka tla i crva za određivanje koncentracije ispitivane tvari;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda zraka, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;
5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
8 - 9	Isto kao i 3. dan;
10	Isto kao i 1. dan;
11 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
15 - 16	Isto kao i 3. dan;
17	Isto kao i 1. dan;
18 - 20	Isto kao i 3. dan;

▼**M4**

Dan	Djelatnost
21	Isto kao i 1. dan; mjerenje temperature i pH tla; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda; kraj faze apsorpcije; prijenos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadržavaju čisto tlo za fazu eliminacije (bez pražnjenja crijeva); uzorkovanje tla i crva iz kontrola s otapalima.
	Djelatnosti prethodnog izlaganja (fazu uravnoteženja) treba planirati uzimajući u obzir svojstva ispitivane kemikalije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba provoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

(b) Faza eliminacije

Dan	Djelatnost
– 6	Priprema i vlaženje sastojaka tla; kondicioniranje pripremljenog tla 48 h;
– 4	Miješanje sastojaka tla; podjela tla na ispitne posude; inkubacija u uvjetima ispitivanja 4 dana;
0 (kraj faze apsorpcije)	Mjerenje temperature i pH tla; vaganje i nasumična raspodjela crva na ispitne posude; dodavanje porcije hrane; prijenos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadržavaju čisto tlo; uzimanje uzoraka tla i crva nakon 4 - 6 dana za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije;
1	Kontrola dovoda zraka, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka tla i crva za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda zraka, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;
5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
8 - 9	Isto kao i 3. dan;
10	Isto kao i 1. dan;
11 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
15 - 16	Isto kao i 3. dan;
17	Isto kao i 1. dan;

▼M4

Dan	Djelatnost
18 - 20	Isto kao i 3. dan;
21	Isto kao i 1. dan; mjerenje temperature i pH tla; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda; uzorkovanje tla i crva iz kontrola s otapalima.
	Pripremu tla prije početka faze eliminacije treba obaviti na isti način kao i prije faze apsorpcije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba provoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

Ispitivanje s enhitrejima

(a) Faza apsorpcije s osam datuma uzorkovanja korištenih za izračun kinetike

Dan	Djelatnost
– 6	Kondicioniranje pripremljenog tla 48 h;
– 4	Obrada dijela tla spikingom s otopinom ispitivane kemikalije; isparavanje eventualnih otapala; miješanje sastojaka tla; raspodjela tla u ispitne posude; uravnoteženje u uvjetima ispitivanja četiri dana (tri tjedna za tlo obrađeno spikingom s metalima);
– 3 do – 1	Vađenje pokusnih organizama iz uzgojene kulture radi aklimatizacije; priprema i vlaženje sastojaka tla;
0	Mjerenje temperature i pH tla; vađenje uzoraka tla iz ispitnih posuda i kontrola s otapalom radi određivanja koncentracije ispitivane kemikalije; dodavanje porcije hrane u tlo; vaganje i nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude; zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva za određivanje analitičkih pozadinskih vrijednosti, mokre i suhe mase te sadržaja lipida; vaganje svih ispitnih posuda radi kontrole vlažnosti tla; kontrola dovoda zraka ako se koristi zatvoreni sustav ispitivanja;
1	Kontrola dovoda zraka, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka tla i crva za određivanje koncentracije ispitivane tvari;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda zraka, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;
5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane u tlo; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
9	Isto kao i 1. dan;
10	Isto kao i 3. dan;

▼**M4**

Dan	Djelatnost
11	Isto kao i 1. dan;
12 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane u tlo; mjerenje temperature i pH tla; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda; kraj faze apsorpcije; prijenos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadržavaju čisto tlo za fazu eliminacije (bez pražnjenja crijeva); uzorkovanje tla i crva iz kontrola s otapalima.
	Djelatnosti prethodnog izlaganja (fazu uravnoteženja) treba planirati uzimajući u obzir svojstva ispitivane kemikalije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba provoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

▼M4

Dodatak 4.

Umjetno tlo – preporuke za pripremu i skladištenje

Budući da je moguće da tijekom cijele godine neće biti dostupna prirodna tla iz određenog izvora, a da prirođeni organizmi kao i prisustvo mikroonečišćivača mogu utjecati na ispitivanje, za uporabu u ovom ispitivanju preporučuje se umjetni supstrat, umjetno tlo prema poglavlju C.8 ovog Priloga, Toksičnost za gujavice (48). U tom tlu može preživjeti, narasti i razmnožavati se nekoliko pokusnih vrsta, a omogućeni su i maksimalna standardizacija, kao i intra- i interlaboratorijska poredbenost uvjeta ispitivanja i uzgoja.

Sastojci tla

Treset:	10 %	Sphagnum treset, u skladu sa Smjernicom OECD-a 207 (48),
Kremeni pijesak:	70 %	Industrijski kremeni pijesak (sušen na zraku); veličina zrna: više od 50 % čestica treba biti u rasponu od 50-200 μm, ali sve čestice trebaju biti ≤ 2 mm,
Kaolinitska glina:	20 %	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %,
Kalcijev karbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, u prahu, kemijski čist.

Kao druga mogućnost, može se smanjiti sadržaj organskog ugljika u umjetnom tlu, npr. smanjenjem sadržaja treseta na 4-5 % suhog tla i sukladnim povećanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjenjem sadržaja organskog ugljika može se smanjiti mogućnost adsorpcije ispitivane kemikalije u tlo (organski ugljik), a može se povećati dostupnost ispitivane kemikalije crvima (74). Pokazalo se da vrste *Enchytraeus albidus* i *Eisenia fetida* ispunjavaju validacijske kriterije o razmnožavanju kada se ispituju u tlima nižeg sadržaja organskog ugljika, npr. 2,7 % (33), (201), a iskustvo pokazuje da se to može postići i s umjetnim tlom s 5 % treseta.

Priprema

Suhi sastojci tla temeljito se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijskoj miješalici). To treba učiniti otprilike tjedan dana prije početka ispitivanja. Izmiješane suhe sastojke tla treba navlažiti deioniziranom vodom najmanje 48 h prije primjene ispitivane tvari kako bi se uravnotežila/stabilizirala kiselost. Za određivanje pH koristi se smjesa tla i otopina 1 M KCl u omjeru 1:5. Ako se pH vrijednost ne kreće unutar raspona (6,0 ± 0,5), tlu se dodaje dovoljna količina $CaCO_3$ ili se pripremi nova šarža tla.

Maksimalni vodni kapacitet (WHC) umjetnog tla određuje se prema ISO 11268-2 (35). Najmanje dva dana prije početka ispitivanja vlaži se suho umjetno tlo dodavanjem dovoljno deionizirane ili obrađene vode da bi se dobilo otprilike pola konačnog sadržaja vode. Konačni sadržaj vode treba iznositi 40 % do 60 % maksimalnog WHC-a. Na početku ispitivanja prethodno navlaženo tlo dijeli se u onoliko šarži koliko ima ispitnih koncentracija i kontrola koje se koriste za ispitivanje, a sadržaj vlage se podešava na od 40 - 60 % WHC_{max} pomoću otopine ispitivane tvari i/ili dodavanjem deionizirane ili obrađene vode. Sadržaj vlage određuje se na početku i na kraju ispitivanja (na 105 °C). On bi trebao biti optimalan za zahtjeve vrsta (sadržaj vlage može se provjeriti i na sljedeći način: kad se tlo blago zgnječi rukom, među prstima bi se trebale pojaviti sitne kapljice).

▼M4

Skladištenje

Suhi sastojci umjetnog tla mogu se skladištiti na sobnoj temperaturi do uporabe. Pripremljeno, prethodno navlaženo tlo može se skladištiti na hladnom mjestu do tri dana prije spikinga; treba se pobrinuti da se isparavanje vode svede na minimum. Tlo obrađeno spikingom s ispitivanom tvari treba se iskoristiti odmah, osim ako ne postoje podaci koji naznačuju da bi se to određeno tlo moglo skladištiti, a da to nema utjecaja na toksičnost i bioraspoloživost ispitivane tvari. Onda se uzorci spikingom obrađenog tla mogu skladištiti do analize u uvjetima preporučenima za određenu ispitivanu tvar.

▼M4

Dodatak 5.

Vrste kopnenih oligoheta preporučene za ispitivanje bioakumulacije iz tla

Gujavice

Preporučuje se pokusna vrsta *Eisenia fetida* (Savigny 1826), koja pripada obitelji Lumbricidae. Od 1972. godine ona se dijeli na dvije podvrste (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* (10)). Po Jaenikeu (36) to su prave, zasebne vrste. *Eisenia fetida* lako se raspoznaje po svojim svijetlim žutim trakama između članaka, dok je *Eisenia andrei* jednoobrazne, tamno-crvene boje. Obje vrste podrijetlo vuku najvjerojatnije iz područja Crnog mora, ali su danas raširene po cijelom svijetu, poglavito u antropogenski izmijenjenim staništima, poput gomila komposta. Obje se mogu koristiti i za ispitivanja ekotoksičnosti i za ispitivanja bioakumulacije.

Eisenia fetida i *Eisenia andrei* dostupne su i u trgovinama, npr. kao mamac za ribe. U usporedbi s ostalim gujavicama iz obitelji Lumbricidae te dvije vrste imaju kratak životni ciklus, a zrelost postižu u roku od 2-3 mjeseca (na sobnoj temperaturi). Njihova optimalna temperatura iznosi otprilike 20 – 24 °C. Prednost daju relativno vlažnim supstratima čija je pH gotovo neutralna i koji imaju visok sadržaj organskih tvari. Budući da se te vrste naširoko koriste u standardiziranim ispitivanjima ekotoksičnosti već 25 godina, njihov uzgoj ima dugu tradiciju (48) (77).

Obje se vrste mogu uzgajati u širokom rasponu životinjskog otpada. Medij za uzgoj koji preporučuje ISO (35) je mješavina konjskog ili govedskog izmeta i treseta u omjeru 50:50. pH vrijednost tog medija treba biti oko 6 do 7 (regulira se kalcijevim karbonatom), treba imati nisku ionsku provodlljivost (manje od 6 mS/cm ili manje od 0,5 % koncentracije soli) i ne smije biti prekomjerno onečišćen amonijakom ili životinjskim urinom. Isto tako, mogu se koristiti tlo za vrtove iz trgovina koje ne sadržava aditive ili umjetno tlo prema OECD-u (48) ili njihova mješavina u omjeru 50:50. Supstrat bi trebao biti vlažan, ali ne previše mokar. Prikladne su kutije za uzgoj volumena od 10 do 50 litara.

Da bi se dobili crvi standardne starosti i mase, najbolje je uzgoj započeti s kokonima. Dakle, odrasli se crvi dodaju u kutiju za uzgoj koja sadržava svježi supstrat kako bi nastali kokoni. Praktično iskustvo pokazuje da gustoća naseljenosti od otprilike 100 odraslih crva na kg supstrata (mokre mase) vodi do dobrih brzina razmnožavanja. Nakon 28 dana odrasli se crvi vade. Gujavice koje se izvale iz kokona koriste se a ispitivanje kad sazriju nakon najmanje dva mjeseca, ali kraće od 12 mjeseci.

Može se smatrati da su crvi gore opisanih vrsta zdravi ako se kreću kroz supstrat, ne pokušavaju izići iz supstrata i ako se neprekidno razmnožavaju. Sporo kretanje ili stražnji dio žute boje (u slučaju *Eisenia fetida*) znak su iscrpljenosti supstrata. U tom se slučaju preporučuju svježi supstrat i/ili manji broj životinja po kutiji.

Dodatne odabrane reference

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. str. 331-338.

Enhitreji

Preporučena pokusna vrsta je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (bijeli crvi). *Enchytraeus albidus* jedna je od najvećih (do 15 mm) vrsta kolutićavih oligoheta iz obitelji Enchytraeidae i distribuira se diljem svijeta, npr. (8). *Enchytraeus albidus* može se naći u morskim, limničkim i kopnenim staništima, uglavnom u organskoj tvari u raspadu (morska trava, kompost), a rijetko na livadama (42). Ta velika ekološka tolerancija i neke morfološke varijacije znak su da je moguće da postoji više podvrsta ove vrste.

Enchytraeus albidus dostupna je u trgovinama, gdje se prodaje kao hrana za ribe. Treba provjeriti je li kultura onečišćena drugom, obično manjom vrstom (60). Ako dođe do onečišćenja, sve crve treba oprati vodom u petri zdjelici. Potom se veliki primjerci vrste *Enchytraeus albidus* biraju (stereomikroskopom) za početak nove kulture. Svi se ostali crvi bacaju. Oni imaju kratak životni ciklus kako se zrelost postiže već od 33. dana (na 18 °C) i 74. dana (na 12 °C). Za ispitivanje treba koristiti samo kulture koje su najmanje 5 tjedana (jedan naraštaj) držane u laboratoriju bez problema.

Prikladne su i druge vrste iz roda *Enchytraeus,* poglavito *Enchytraeus luxuriosus.* Ta je vrsta pravi stanovnik tla, koje smo opisali u (65). Ako se koriste druge vrste *Enchytraeus*, treba ih jasno identificirati i u izvješću treba navesti obrazloženje za odabir te vrste.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) je vrsta koja spada u istu skupinu kao i *Enchytraeus luxuriosus*. Nije dokazano da ona sa sigurnošću nastanjuje polja, samo je opisana za uzgoj kulture crva i gomile komposta (Römbke 2003). Stoga nisu poznati njezini izvorni ekološki zahtjevi. Međutim, skorašnje laboratorijske studije različitih tala iz polja potvrdile su da ova vrsta ima veliku toleranciju na svojstva tla, poput pH i teksture (Jänsch i sur. 2005). U novije se vrijeme upravo ta vrsta često koristila u studijama ekotoksičnosti, i to radi jednostavnosti njezina uzgoja i ispitivanja, npr. Kuperman i sur. 2003). Međutim, ona je malena (3 – 12 mm; u prosjeku 7 mm (Westheide & Müller 1996), a zbog toga je rukovanje njome znatno teže u usporedbi s *Enchytraeus albidus*. Kad se koristi neka druga vrsta umjesto *Enchytraeus albidus*, ispitna posuda može, ali i ne mora biti manja. Osim toga, treba uzeti u obzir i to da se ova vrsta rapidno razmnožava, a naraštaji se smjenjuju brže od svakih 20 dana na 20 ± 2 °C (Achazi i sur. 1999), a na višim temperaturama čak i brže.

Enhitreji iz vrste *Enchytraeus albidus* (kao i iz ostalih vrsta *Enchytraeus*) mogu se uzgajati velikim plastičnim kutijama (npr. 30 × 60 × 10 cm ili 20 × 12 × 8 cm, što je prikladno za uzgoj crva male veličine) napunjenima mješavinom umjetnog tla i neonečišćenog vrtnog tla bez aditiva koje se može kupiti u trgovinama. Treba izbjegavati kompost jer on može sadržavati toksične kemikalije poput teških metala. Prije uporabe iz tla za uzgoj treba odstraniti faunu dubokim smrzavanjem u tri navrata. Može se koristiti i čisto umjetno tlo, ali je moguće da će brzina razmnožavanja biti manja u usporedbi s onom koja se razvija kod miješanih supstrata. pH supstrata treba iznositi 6,0 ± 0,5. Kultura se drži u inkubatoru na temperaturi od 15 ± 2 °C bez svjetla. U svakom slučaju treba izbjegavati temperature iznad 23 °C. Umjetno/prirodno tlo treba biti vlažno, ali ne mokro. Kad se tlo blago stisne rukama, trebaju se pojaviti samo sitne kapljice vode. U svakom slučaju treba izbjegavati anoksične uvjete (npr. ako se koristi poklopac, mora postojati dovoljno otvora na poklopcu za dostatnu razmjenu zraka). Tlo za uzgoj treba dozračivati pažljivim miješanjem jedanput tjedno.

▼M4

Crve treba hraniti najmanje jedanput tjedno ad libitum usitnjenom zobi koja se stavlja u šupljinu na površini tla i prekriva tlom. Ako u spremniku ostane hrana preostala od posljednjeg hranjenja, sukladno tome treba prilagoditi količinu nove hrane. Ako na preostaloj hrani narastu gljivice, hranu treba zamijeniti novom količinom usitnjene zobi. Da bi se pospješilo razmnožavanje, usitnjena se zob može svaka dva tjedna zamijeniti proteinskim prahom modificiranim vitaminima, dostupnim u trgovinama. Nakon tri mjeseca životinje se prenose u svježe pripremljenu kulturu ili supstrat za uzgoj. Usitnjenu zob, koja se mora čuvati u zatvorenim posudama, treba obraditi u autoklavu ili je treba zagrijati prije uporabe kako bi se izbjegle infekcije grinjama iz brašna (npr. *Glyzyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) ili grabežljive grinje (npr. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Nakon dezinfekcije hrana se usitnjava da bi se mogla lakše rasuti po površini tla. Još jedan mogući izvor je pekarski kvasac ili riblja hrana TetraMin®.

Općenito gledano, uvjeti uzgoja su povoljni ako crvi ne pokušavaju izići iz supstrata, ako se brzo kreću kroz tlo, imaju sjajnu vanjsku površinu na koju se ne lijepe čestice tla, više-manje su bijele boje i ako se vide crvi različite starosti. Zapravo, može se smatrati da su crvi zdravi ako se neprekidno razmnožavaju.

Dodatne odabrane reference

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. TEST NA KOPNENOM BILJU: ISPITIVANJE NICANJA I RASTA KLIJANACA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 208 (2006.). Ispitne se metode periodički preispituju u svjetlu znanstvenoga napretka i primjenjivosti za regulatorne svrhe. Ova ažurirana ispitna metoda namijenjena je ocjenjivanju mogućih učinaka kemikalija na nicanje i rast klijanaca. Kao takva ne obuhvaća kronične učinke ili učinke na razmnožavanje (tj. zametanje sjemena, formiranje cvjetova i sazrijevanje plodova). Kako bi se osigurao odabir primjerenih ispitnih metoda, mora se voditi računa o uvjetima izloženosti i svojstvima kemikalije koja će se ispitivati (npr. kada se ispituju metali/spojevi metala, treba voditi računa o učincima pH-vrijednosti i pripadajućim protuionima) (1). Ovom se ispitnom metodom ne ispituje bilje izloženo parama kemikalija. Ispitna se metoda može primijeniti za ispitivanje kemikalija u općoj uporabi, biocida i proizvoda za zaštitu usjeva (poznatih i kao sredstva za zaštitu bilja ili pesticidi). Razvijena je na temelju postojećih metoda (2) (3) (4) (5) (6) (7). Razmotrena je i ostala literatura koja se odnosi na ispitivanje bilja (8) (9) (10). Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

2. Ispitivanjem se ocjenjuju učinci na nicanje klijanaca i rani rast viših biljaka nakon izloženosti ispitivanoj kemikaliji u tlu (ili drugoj prikladnoj matrici tla). Sjeme se stavi u dodir sa zemljom koja je tretirana ispitivanom kemikalijom čiji se učinci ocjenjuju obično nakon 14 do 21 dana nakon što nikne 50 % klijanaca u kontrolnoj skupini. Krajnje točke koje se mjere jesu vizualna procjena nicanja klijanaca, masa suhe tvari izdanka (alternativno masa svježe tvari izdanka) i u određenim slučajevima visina izdanka, kao i procjena vidljivih štetnih učinaka na različite dijelove biljke. Ta se mjerenja i zapažanja uspoređuju s onima kod netretiranih kontrolnih biljaka.

3. Ovisno o očekivanom putu izlaganja, ispitivana se kemikalija unosi u zemlju (ili eventualno u matricu umjetne zemlje) ili se primjenjuje na površinu zemlje, što pravilno predstavlja mogući put izlaganja kemikaliji. Kemikalija se unosi u zemlju tretiranjem zemlje u rasulu. Nakon primjene kemikalije zemlja se premješta u uzgojne posude, u koje se potom sije sjeme određene biljne vrste. Kod površinske primjene kemikalija se primjenjuje na zemlju u posudama u koju je već posijano sjeme. Ispitne jedinice (kontrole i tretirana zemlja plus sjeme) potom se stavljaju u odgovarajuće uvjete kako bi se potaknulo klijanje/rast biljaka.

4. Ispitivanje se može provesti kako bi se odredila krivulja doza-odgovor ili kao granični test sa samo jednom koncentracijom / dozom primjene u skladu s ciljem studije. Ako rezultati dobiveni ispitivanjem sa samo jednom koncentracijom / dozom primjene premašuju određenu razinu toksičnosti (npr. uoče li se učinci veći od x %), provodi se ispitivanje za određivanje raspona kako bi se odredile gornja i donja granica toksičnosti, nakon čega se provodi ispitivanje s više koncentracija / doza primjene kako bi se dobila krivulja doza-odgovor. Odgovarajućom statističkom analizom izračunava se učinkovita koncentracija EC_x ili učinkovita doza primjene ER_x (npr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) za najosjetljiviji parametar ili najosjetljivije parametre koji se ispituju. Osim toga, ovim se ispitivanjem može izračunati najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

5. Sljedeće su informacije korisne za utvrđivanje očekivanog puta izloženosti kemikaliji i za planiranje ispitivanja: strukturna formula, čistoća, topljivost u

▼M6

vodi, topljivost u organskim otapalima, koeficijent razdjeljenja 1-oktanol/voda, sorpcijsko ponašanje u tlu, tlak para, kemijska stabilnost u vodi i na svjetlosti te biorazgradivost.

VALJANOST ISPITIVANJA

6. Da bi ispitivanje bilo valjano, kontrole moraju zadovoljavati sljedeće kriterije uspješnosti:

— nicanje klijanaca iznosi najmanje 70 %,

— klijanci ne pokazuju vidljive fitotoksične učinke (npr. klorozu, nekrozu, uvenuće, deformacije lista i stabljike) i biljke pokazuju uobičajene varijacije u rastu i morfologiji za predmetnu vrstu,

— srednja stopa preživljavanja izniklih kontrolnih klijanaca iznosi najmanje 90 % tijekom trajanja istraživanja,

— okolišni su uvjeti za određenu vrstu identični, a uzgojni mediji sadržavaju istu količinu matrice tla, pomoćnih medija ili supstrata iz istog izvora.

REFERENTNA KEMIKALIJA

7. Ispitivanjem referentne kemikalije u redovitim vremenskim razmacima može se provjeriti jesu li se provođenje ispitivanja i odgovor određenih ispitnih biljaka te uvjeti ispitivanja značajno promijenili tijekom vremena. Alternativno se mogu upotrijebiti prijašnja mjerenja biomase ili rasta kontrola kako bi se ocijenila uspješnost ispitnih sustava u pojedinim laboratorijima, a mogu poslužiti i za kontrolu kvalitete unutar laboratorija.

OPIS METODE

Prirodno tlo – umjetni supstrat

8. Biljke se mogu uzgajati u posudama s pjeskovitom ilovačom, ilovastim pijeskom ili pjeskovito glinastom ilovačom koja sadržava do 1,5 % organskog ugljika (oko 3 % organske tvari). Može se upotrijebiti i komercijalna zemlja za lončanice ili sintetička mješavina zemlje koja sadržava do 1,5 % organskog ugljika. Ne smije se upotrijebiti glinovita zemlja ako je poznato da ispitivana kemikalija ima visoki afinitet za gline. Zemlju s polja treba prosijati na veličinu čestica 2 mm kako bi se homogenizirala i kako bi se uklonile grube čestice. Treba dokumentirati vrstu i teksturu, postotak organskog ugljika, pH te udio soli koji se mjeri kao električna vodljivost konačne pripremljene zemlje. Zemlju treba klasificirati prema standardnoj klasifikacijskoj shemi (11). Zemlja se može pasterizirati ili toplinski obraditi kako bi se smanjio učinak patogena iz tla.

9. Uporaba prirodne zemlje može otežati tumačenje rezultata i povećati varijabilnost zbog varirajućih fizikalno-kemijskih svojstava i mikrobnih populacija. Te varijable mogu pak izmijeniti sposobnost zadržavanja vlažnosti, sposobnost vezanja kemikalija, dotok zraka te udio hranjivih sastojaka i elemenata u tragovima. Osim varijacija u navedenim fizikalnim faktorima, postojat će i varijacije u kemijskim svojstvima, kao što su pH-vrijednost i redoks-potencijal, koja mogu utjecati na bioraspoloživost ispitivane kemikalije (12) (13) (14).

10. Umjetni se supstrati u pravilu ne upotrebljavaju za ispitivanje sredstava za zaštitu bilja, ali se mogu upotrijebiti za ispitivanje kemikalija u općoj uporabi ili kad se želi smanjiti varijabilnost prirodnih tala i povećati usporedivost rezultata ispitivanja. Upotrijebljeni se supstrati moraju sastojati od inertnih materijala koji u najvećoj mogućoj mjeri smanjuju interakciju s ispitivanom kemikalijom, nosačem otapala ili jednim i drugim. Pokazalo se da su kremeni pijesak ispran kiselinom, mineralna vuna i staklena zrnca (npr. promjera od 0,35 do 0,85 mm) prikladni inertni materijali koji minimalno

▼M6

apsorbiraju ispitivanu kemikaliju (15), čime se osigurava maksimalna dostupnost kemikalije klijancu putem korijena. Vermikulit, perlit i ostali jaki apsorbenti nisu prikladni supstrati. Potrebno je osigurati nutrijente za rast bilja kako bi se spriječio stres biljaka zbog nutritivnog deficita, koji gdje je moguće treba procijeniti kemijskom analizom ili vizualnim pregledom kontrolnih biljaka.

Kriteriji za odabir ispitnih vrsta

11. Kako bi se dobio niz odgovora, raspon odabranih vrsta mora biti prilično širok, npr. u smislu njihove taksonomske raznolikosti u carstvu biljaka, njihove rasprostranjenosti, brojnosti, značajki životnog ciklusa koje su specifične za vrstu te područja prirodnog rasta (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Pri odabiru potrebno je uzeti u obzir sljedeća svojstva mogućih ispitnih vrsta:

— vrsta ima ujednačeno sjeme koje se može nabaviti iz pouzdanih izvora standardnog sjemena i koje klija redovito, pouzdano i ujednačeno te daje klijance ujednačenog rasta,

— biljka se može ispitivati u laboratoriju i može dati pouzdane i obnovljive rezultate, kako unutar istog, tako i u različitim objektima u kojima se provodi ispitivanje,

— osjetljivost ispitivane vrste mora biti u skladu s reakcijama biljaka koje se mogu pronaći u okolišu izloženom kemikaliji,

— vrsta je u određenoj mjeri već bila upotrebljavana u prethodnim ispitivanjima toksičnosti i njezino ponašanje u primjerice biološkim ispitivanjima (biotestovima) herbicida, testovima probira na teške metale, testovima na salinitetni ili mineralni stres ili u istraživanjima alelopatije ukazuje na postojanje velikog broja stresora,

— spojiva je s uvjetima rasta koji su predviđeni ispitnom metodom,

— ispunjuje kriterije valjanosti ispitivanja.

Neke od vrsta koje su se najviše upotrebljavale u dosadašnjim ispitivanjima navedene su u Dodatku 2., a moguće nepoljoprivredne vrste navedene su u Dodatku 3.

12. Broj vrsta koje će se ispitivati ovisi o odgovarajućim regulatornim zahtjevima pa taj broj nije određen u ovoj ispitnoj metodi.

Primjena ispitivane kemikalije

13. Kemikaliju treba primijeniti u odgovarajućem nosaču (npr. vodi, acetonu, etanolu, polietilen glikolu, gumi arabici ili pijesku). Mogu se ispitivati i mješavine (formulirani proizvodi ili formulacije) koje sadržavaju aktivne sastojke i različita pomoćna sredstva.

Unošenje u tlo / umjetni supstrat

14. Kemikalije koje su topljive ili suspendirane u vodi mogu se dodati u vodu, a otopina se potom pomiješa sa zemljom odgovarajućim uređajem za miješanje. Ova vrsta testa može biti primjerena ako do izlaganja kemikaliji dolazi kroz tlo ili pornu vodu i postoji rizik od njezina unošenja putem korijena. Dodavanjem ispitivane kemikalije ne smije se premašiti kapacitet tla za vodu. Količina dodane vode mora biti ista za svaku ispitnu koncentraciju, ali mora biti ograničena kako bi se spriječilo stvaranje grudastih nakupina zemlje.

▼M6

15. Kemikalije niske topljivosti u vodi treba otopiti u odgovarajućem hlapljivom otapalu (npr. acetonu, etanolu) te pomiješati s pijeskom. Otapalo se potom može ukloniti iz pijeska mlazom zraka uz stalno miješanje pijeska. Tretirani se pijesak pomiješa s pokusnom zemljom. Priprema se druga kontrola koja se sastoji samo od pijeska i otapala. Svim razinama tretmana i drugoj kontroli dodaju se jednake količine pijeska u koji je otapalo bilo umiješano i potom uklonjeno. U slučaju krutih, netopljivih ispitnih kemikalija u odgovarajućem se uređaju za miješanje pomiješaju suha zemlja i kemikalija. Potom se zemlja dodaje u uzgojne posude i odmah se sije sjeme.

16. Kada se umjesto zemlje upotrebljava umjetni supstrat, kemikalije topljive u vodi mogu se otopiti u hranjivoj otopini netom prije početka ispitivanja. Kemikalije koje nisu topljive u vodi, ali se mogu suspendirati u vodi uporabom nosača otapala, treba u hranjivu otopinu dodati s nosačem. Kemikalije netopljive u vodi za koje ne postoji netoksični nosač topljiv u vodi potrebno je otopiti u odgovarajućem hlapljivom otapalu. Otopina se pomiješa s pijeskom ili staklenim kuglicama, stavi u okretni vakuumski isparivač gdje isprava, nakon čega na pijesku ili kuglicama ostaje ujednačen sloj kemikalije. Odmjereni dio kuglica ekstrahira se istim organskim otapalom te se odredi količina kemikalije prije punjenja uzgojnih posuda.

Površinska primjena

17. U slučaju sredstava za zaštitu bilja ispitivana se kemikalija često primjenjuje raspršivanjem ispitne otopine po površini tla. Sva oprema koja se upotrebljava za provođenje ispitivanja, uključujući opremu za pripremanje i primjenu ispitivane kemikalije, mora biti takve izrade i kapaciteta da omogući ispravno provođenje ispitivanja uz obnovljivu pokrivenost. Pokrivenost mora biti ujednačena na svim površinama tla. Potrebno je voditi brigu o tome da se izbjegne mogućnost adsorpcije kemikalija na opremu ili njihove reakcije s opremom (npr. plastične cijevi i lipofilne kemikalije ili čelični dijelovi i elementi). Ispitivana se kemikalija raspršuje po površini tla simuliranjem tipične primjene s pomoću prskalice. Količine koje se raspršuju općenito moraju biti u rasponu količina koje se upotrebljavaju u uobičajenoj poljoprivrednoj praksi i treba ih zabilježiti (količina vode itd.). Treba odabrati takvu vrstu mlaznice koja će osigurati ujednačenu pokrivenost površine tla. Ako se primjenjuju otapala i nosači, treba uspostaviti još jednu skupinu kontrolnih biljaka koje će primati samo otapalo/nosač. To nije potrebno za sredstva za zaštitu bilja koja se ispituju kao formulacije.

Verifikacija koncentracije / doze primjene ispitivane kemikalije

18. Odgovarajućom analitičkom verifikacijom moraju se potvrditi koncentracije / doze primjene. Za topljive se kemikalije verifikacija svih ispitnih koncentracija / doza primjene može potvrditi analizom ispitne otopine najveće koncentracije, s dokumentacijom o naknadnom razrjeđenju i uporabi kalibrirane opreme za primjenu (npr. kalibrirane analitičke staklene posude i kalibriranje opreme za primjenu škropiva). Za netopljive se kemikalije verifikacija mora poduprijeti masama ispitne kemikalije dodane tlu. Ako je potrebno dokazati homogenost, može biti potrebna analiza tla.

POSTUPAK

Plan ispitivanja

19. Sjeme iste vrste posije se u uzgojne posude. Broj sjemenki posijanih u pojedinoj posudi ovisit će o vrsti, veličini posude i trajanju ispitivanja. Broj biljaka po posudi mora biti takav da omogući primjerene uvjete rasta i spriječi preveliku gustoću za vrijeme trajanja ispitivanja. Maksimalna gustoća sjemena iznosi oko tri do deset sjemenki na 100 cm^2, ovisno o veličini sjemena. Na primjer, preporučuju se jedna do dvije biljke kukuruza,

▼M6

soje, rajčice, krastavca ili šećerne repe po posudi od 15 cm, tri biljke repe ili graška po posudi od 15 cm te pet do deset sjemenki luka, pšenice ili drugog sitnog sjemena po posudi od 15 cm. Broj sjemenki i ponavljanja (ponavljanje se definira kao jedna uzgojna posuda pa biljke u istoj posudi nisu ponavljanje) mora biti takav da osigura optimalnu statističku analizu (21). Valja napomenuti da će varijabilnost biti veća kod ispitnih vrsta za koje se upotrebljava manji broj velikih sjemenki po posudi (ponavljanju) u usporedbi s ispitnim vrstama kod kojih je moguće upotrijebiti veći broj manjih sjemenki po posudi. Sijanjem jednakog broja sjemenki u svaku posudu ta se varijabilnost može smanjiti.

20. Kontrolne se skupine upotrebljavaju kako bi se osiguralo da se uočeni učinci povezuju isključivo s izloženošću ispitivanoj kemikaliji ili da se pripisuju isključivo toj izloženosti. Odgovarajuća kontrolna skupina mora u svakom pogledu biti identična ispitnoj skupini, osim izloženosti ispitivanoj kemikaliji. Unutar određenog ispitivanja sve ispitne biljke, uključujući kontrole, moraju biti iz istog izvora. Kako bi se izbjegla pristranost, ispitne i kontrolne uzgojne posude potrebno je odrediti slučajnim odabirom.

21. Treba izbjegavati sjeme tretirano insekticidom ili fungicidom (tj. „obloženo” sjeme). Međutim, neka regulatorna tijela dopuštaju primjenu određenih nesistemičnih kontaktnih fungicida (npr. kaptana i tirama) (22). Ako postoji zabrinutost zbog patogena koji se prenose sjemenjem, sjeme se može kratko namakati u slaboj petpostotnoj otopini hipoklorita i potom temeljito isprati tekućom vodom te osušiti. Nije dopušteno nikakvo kurativno tretiranje drugim sredstvom za zaštitu bilja.

Uvjeti ispitivanja

22. Uvjeti ispitivanja moraju biti približni uvjetima koji su potrebni za normalan rast ispitivanih vrsta i sorti (u Dodatku 4. navedeni su primjeri uvjeta ispitivanja). Iznikle biljke potrebno je održavati u skladu s dobrom hortikulturnom praksom u kontroliranim uvjetima u komorama, fitotronima ili staklenicima. Ako se upotrebljavaju objekti za rast, ta praksa obično uključuje kontrolu i primjereno često (npr. dnevno) bilježenje temperature, vlažnosti, koncentracije ugljičnog dioksida, svjetlosti (intenzitet, valna duljina, fotosintetički aktivno zračenje) te razdoblja svjetlosti, načina zalijevanja itd. kako bi se osigurao dobar rast biljaka koji se ocjenjuje promatranjem kontrolnih biljaka odabranih vrsta. Temperature u stakleniku potrebno je kontrolirati sustavima ventilacije, grijanja i/ili hlađenja. Za ispitivanja u staklenicima općenito se preporučuju sljedeći uvjeti:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— vlaga: 70 % ± 25 %;

— fotoperiod: najmanje 16 sati svjetlosti;

— intenzitet svjetlosti: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Ako intenzitet padne ispod 200 $\mu E/m^2/s$, valne duljine 400 – 700 nm, možda će biti potrebno dodatno osvjetljenje, osim za određene vrste čije su potrebe za svjetlošću manje.

Tijekom trajanja ispitivanja treba pratiti i bilježiti okolišne uvjete. Biljke je potrebno uzgajati u neporoznim plastičnim ili glaziranim posudama postavljenima na podložak ili tanjurić. Posude se mogu periodično premještati kako

▼M6

bi se smanjila varijabilnost rasta biljaka (zbog razlika u uvjetima ispitivanja unutar objekta za uzgoj). Posude moraju biti dovoljno velike da omoguće normalan rast.

23. Hranjive tvari tla mogu se prema potrebi dopuniti kako bi se održao dobar vigor biljaka. Potreba za dodatnim hranjivim tvarima i vrijeme njihova dodavanja mogu se procijeniti promatranjem kontrolnih biljaka. Preporučuje se zalijevati ispitne posude odozdo (npr. uporabom vrpci od staklenih vlakana). Međutim, prvo zalijevanje može biti površinsko kako bi se potaknulo klijanje sjemena i, kad je riječ o sredstvu koje se primjenjuje po površini tla, kako bi se olakšalo prodiranje kemikalije u tlo.

24. Specifični uvjeti rasta moraju biti primjereni za ispitnu vrstu i ispitivanu kemikaliju. Kontrolne i tretirane biljke moraju se držati u istim okolišnim uvjetima, ali treba poduzeti odgovarajuće mjere za sprječavanje unakrsne izloženosti (npr. zbog hlapljivih kemikalija) među različitim tretmanima, kao i izloženosti kontrola ispitivanoj kemikaliji.

Ispitivanje s jednom koncentracijom / dozom primjene

25. Pri određivanju odgovarajuće koncentracije / doze primjene kemikalije koja će se upotrijebiti u testu s jednom koncentracijom ili dozom primjene (test izazova / granični test) mora se uzeti u obzir više faktora. Kad je riječ o kemikalijama u općoj uporabi, ti faktori uključuju njihova fizikalno-kemijska svojstva. Kad je riječ o sredstvima za zaštitu bilja, potrebno je uzeti u obzir fizikalno-kemijska svojstva i obrazac uporabe ispitivane kemikalije, njezinu maksimalnu koncentraciju ili dozu primjene, broj primjena po sezoni i/ili njezinu postojanost. Da bi se odredilo ima li kemikalija u općoj uporabi fitotoksična svojstva, može biti primjereno ispitati maksimalnu količinu od 1 000 mg/kg suhog tla.

Ispitivanje za određivanje raspona

26. Prema potrebi može se provesti ispitivanje za određivanje raspona kako bi se dobile smjernice o tome koje bi koncentracije / doze primjene trebalo ispitati u glavnom istraživanju odnosa između doze i odgovora. Kod ispitivanja za određivanje raspona potrebno je odabrati ispitne koncentracije / doze primjene sa širokim intervalima (npr. 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suhog tla). Ako je riječ o sredstvima za zaštitu bilja, koncentracije / doze primjene mogu se temeljiti na preporučenoj ili maksimalnoj koncentraciji odnosno dozi primjene, npr. 1/100, 1/10, 1/1 preporučene/maksimalne koncentracije ili doze primjene.

Ispitivanje s više koncentracija / doza primjene

27. Svrha je ispitivanja s više koncentracija / doza primjene utvrditi odnos između doze i odgovora te odrediti vrijednost EC_x ili ER_x za nicanje, biomasu i/ili vizualne učinke u usporedbi s neizloženim kontrolama, kako to zahtijevaju regulatorna tijela.

28. Broj i interval između koncentracija ili doza primjene moraju biti dovoljni da se može pouzdano utvrditi odnos između doze i odgovora i regresijska jednadžba te procijeniti vrijednost $EC_{x.}$ ili $ER_{x.}$. Odabrane koncentracije / doze primjene moraju obuhvaćati vrijednosti EC_x ili ER_x koje je potrebno odrediti. Na primjer, ako se traži vrijednost EC_{50}, poželjno je provesti ispitivanje s dozama primjene koje proizvode 20-postotni do 80-postotni učinak. Da bi se to postiglo, preporučuje se najmanje pet ispitnih koncentracija / doza primjene u geometrijskom nizu, plus netretirana kontrola, s faktorom ne

▼M6

većim od tri. Za svaku ispitnu i kontrolnu skupinu potrebna su najmanje četiri ponavljanja, a ukupan broj sjemenki mora iznositi najmanje 20. Za određene biljke koje imaju nizak stupanj klijavosti ili promjenjive značajke rasta ponekad je potrebno više ponavljanja kako bi se povećala statistička snaga ispitivanja. Ako se upotrebljava veći broj ispitnih koncentracija / doza primjene, broj ponavljanja može se smanjiti. Ako treba odrediti NOEC, možda će biti potrebno više ponavljanja kako bi se postigla željena statistička snaga (23).

Promatranja

29. Razdoblje promatranja, tj. 14 do 21 dan nakon što nikne 50 % kontrolnih biljaka (i kontrola s otapalom, ako je primjenjivo), biljke se učestalo promatraju (najmanje jednom tjedno, a po mogućnosti svakodnevno) kako bi se provjerilo njihovo nicanje te ima li vidljivih znakova fitotoksičnosti i slučajeva uginuća. Na kraju ispitivanja treba zabilježiti izmjereni postotak nicanja te biomasu preživjelih biljaka, kao i štetne učinke vidljive na različitim dijelovima biljke. Štetni učinci uključuju anomalije u izgledu izniklih klijanaca, zakržljali rast, promjenu boje, uginuće te učinke na razvoj biljke. Konačna se biomasa može izmjeriti primjenom konačne prosječne mase suhe tvari izdanka preživjelih biljaka, i to tako da se izdanci uberu pri površini tla te suše do stalne mase na temperaturi od 60 °C. Alternativno, konačna se biomasa može izmjeriti na temelju mase svježe tvari. Druga krajnja točka može biti visina izdanka, ako to zahtijevaju regulatorna tijela. Za ocjenjivanje uočenih toksičnih odgovora potrebno je primjenjivati ujednačeni sustav ocjenjivanja. Praktični primjeri kvalitativnih i kvantitativnih vizualnih ocjenjivanja navedeni su u literaturi (23) (24).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Statistička analiza

Ispitivanje s jednom koncentracijom / dozom primjene

30. Primjerenom statističkom metodom potrebno je analizirati podatke za svaku biljnu vrstu (21). Potrebno je izvijestiti o razini učinka pri ispitnoj koncentraciji / dozi primjene ili o nepostizanju određenog učinka pri ispitnoj koncentraciji / dozi primjene (npr. < *x* % učinka uočenog pri koncentraciji / dozi primjene *y*)

Ispitivanje s više koncentracija / doza primjene

31. Odnos između doze i odgovora utvrđuje se regresijskom jednadžbom. Mogu se upotrijebiti različiti modeli: na primjer, za procjenu vrijednosti EC_x ili ER_x (npr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) i njihovih granica pouzdanosti za nicanje, u obliku kvantalnih podataka, mogu biti prikladni modeli logit, probit i Weibull te Spearman-Karberova metoda i modificirana Spearman-Karberova metoda. Za rast klijanaca (masa i visina) kao stalnih krajnjih točaka, EC_x ili ER_x i njihove granice pouzdanosti mogu se procijeniti primjenom odgovarajuće regresijske analize (npr. Bruce-Versteegove nelinearne regresijske analize (25)). Kad je god moguće, vrijednost R^2 trebala bi iznositi 0,7 ili više za najosjetljivije vrste, a upotrijebljene ispitne koncentracije / doze primjene moraju obuhvaćati 20 % do 80 % učinaka. Ako je potrebno procijeniti NOEC, poželjno je primijeniti snažne statističke testove koje treba odabrati na temelju distribucije podataka (21) (26).

Izvješće o ispitivanju

32. U izvješću o ispitivanju potrebno je navesti rezultate ispitivanja te detaljan opis uvjeta ispitivanja, iscrpnu raspravu o rezultatima, analizu podataka i zaključke izvučene iz analize. Potrebno je navesti sažetak u obliku tablice i sintezu rezultata. Izvješće mora sadržavati sljedeće:

▼**M6**

Ispitivana kemikalija:

— podaci za identifikaciju kemikalije, relevantna svojstva ispitivane kemikalije (npr. log P_{ow}, topljivost u vodi, tlak para te podaci o sudbini i ponašanju u okolišu, ako su dostupni),

— pojedinosti o pripremi ispitne otopine i verifikaciji ispitnih koncentracija, kako je navedeno u stavku 18.

Ispitne vrste:

— pojedinosti o ispitnom organizmu: vrsta/sorta, biljne porodice, znanstveni i uobičajeni nazivi, izvor i povijest sjemena što je moguće detaljnije (tj. ime dobavljača, postotak klijavosti, kategorija veličine sjemena, broj serije ili partije, sjemena godina ili vegetacijsko razdoblje u kojemu je prikupljeno, datum ocjenjivanja klijavosti), vitalnost itd.,

— broj ispitanih vrsta jednosupnica i dvosupnica,

— razlozi za odabir vrsta,

— opis skladištenja, tretiranja i održavanja sjemena.

Uvjeti ispitivanja:

— objekt u kojemu se provelo ispitivanje (npr. uzgojna komora, fitotron i staklenik),

— opis ispitnog sustava (npr. dimenzije uzgojnih posuda, materijal od kojeg su napravljene uzgojne posude te količine zemlje),

— svojstva zemlje (tekstura ili vrsta zemlje: distribucija i klasifikacija čestica zemlje, fizikalna i kemijska svojstva, uključujući postotak organske tvari, postotak organskog ugljika i pH);

— priprema zemlje/supstrata (npr. tlo, umjetno tlo, pijesak i ostalo) prije ispitivanja,

— opis hranjivog medija, ako je upotrijebljen,

— primjena ispitivane kemikalije: opis metode primjene, opis opreme, doza izloženosti i količina, uključujući kemijski provjeru, opis metode umjeravanja i opis okolišnih uvjeta tijekom primjene,

— uvjeti rasta: intenzitet svjetlosti (npr. PAR, fotosintetički aktivno zračenje), fotoperiod, najviše/najniže temperature, raspored i metoda zalijevanja, gnojenje,

— broj sjemenki po uzgojnoj posudi, broj biljaka po dozi, broj ponavljanja (uzgojnih posuda) po dozi izloženosti,

— vrsta i broj kontrola (negativne i/ili pozitivne kontrole te kontrola s otapalom, ako je upotrijebljena),

— trajanje ispitivanja.

Rezultati:

— tablica svih krajnjih točaka za svako ponavljanje, ispitnu koncentraciju / stupanj i vrstu,

— broj i postotak izniklih klijanaca u usporedbi s kontrolama,

— mjerenja biomase biljaka (suha ili svježa masa izdanaka) izražena kao postotak kontrola,

▼M6

— visine izdanaka biljaka izražene kao postotak kontrola, ako su izmjerene,

— postotak vidljivih oštećenja te kvalitativan i kvantitativan opis vidljivih oštećenja (kloroza, nekroza, uvenuće, deformacije lista i stabljike, kao i svako nepostojanje učinaka) koje je uzrokovala ispitna kemikalija, u usporedbi s kontrolnim biljkama,

— opis ljestvice ocjenjivanja primijenjene za procjenu vidljivih oštećenja, ako se izvješćuje o vizualnom ocjenjivanju,

— za ispitivanja s jednom dozom primjene treba navesti postotak oštećenja,

— vrijednosti EC_x ili ER_x (npr. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) i pripadajuće granice pouzdanosti. Ako se provodi regresijska analiza, navodi se standardna pogreška za regresijsku jednadžbu te standardna pogreška za procjenu pojedinačnih parametara (npr. nagiba, sjecišta),

— vrijednosti NOEC (i LOEC) ako su izračunane,

— opis primijenjenih statističkih postupaka i pretpostavki,

— grafički prikaz navedenih podataka i odnosa između doze i odgovora ispitnih vrsta.

Odstupanja od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave tijekom ispitivanja.

LITERATURA

(1) Schrader G., Metge K. i Bahadir M. (1998.) Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189 – 193.

(2) International Organisation of Standards. (1993.) ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995.) ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002.) E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) US EPA. (1982.) FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996.) OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982.) Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993.) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K. E. i Keddy, C. J. (1993.) Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No. 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C. i Zwerger, P. (1997.) Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No. 48.

(10) Hale, B., Hall, J. C., Solomon, K. i Stephenson, G. (1994.) A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985.) i Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962.)

(12) Audus, L. J. (1964.) Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L. J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, poglavlje 5., str. 163. – 206.

(13) Beall, M. L., Jr. i Nash, R. G. (1969.) Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G. D., Kenney, D. R. i Chesters, G. (1969.) Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U. S. Food and Drug Administration (FDA). (1987.) Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, str. 14, FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R. A., Wright, J. P., Honegger, J. L. i Warren, L. W. (2002.) A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. i Kjær, C. (2004.) Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349 – 369.

(18) Boutin, C. i Rogers, C. A. (2000.) Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol. 9(4):255-271.

(19) Boutin, C. i Harper, J. L. (1991.) A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H. B., Peart, T. E., Batchelor, S. P. i Maguire, R. J.. (2000.) Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532 – 2541.

(21) OECD (2006.) Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K. K. i Penner, D. (1985.) Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P. B., Marriage, P. B. i Friesen, G. (1977.) A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R. E. i Talbert, R. E. (1992.) Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2. izdanje, Southern weed Science Society, Auburn, 15 – 23.

(25) Bruce, R. D. i Versteeg, D. J. (1992.) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485 – 1492.

(26) Poglavlje C.33. ovog Priloga: Test reproduktivne toksičnosti na gujavicama (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Aktivni sastojak (a. s.) (ili aktivna tvar (a. t.)): materijal namijenjen postizanju posebnog biološkog učinka (npr. suzbijanje kukaca, suzbijanje bolesti bilja, suzbijanje korova na području tretiranja), poznat i kao tehnički aktivni sastojak ili tehnička aktivna tvar.

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Proizvodi za zaštitu usjeva (PZU) ili sredstva za zaštitu bilja (SZB) ili pesticidi: materijali koji imaju specifično biološko djelovanje i namjerno se primjenjuju radi zaštite usjeva od nametnika (npr. gljivičnih bolesti, kukaca i kompetitivnih biljaka).

EC_x. koncentracija s x-postotnim učinkom ili ER_x. doza s x-postotnim učinkom: koncentracija ili doza koja dovodi do x-postotne neželjene promjene u ispitnoj krajnjoj točki koja se mjeri u odnosu na kontrolu (npr. 25-postotno ili 50-postotno smanjenje broja izniklih klijanaca, mase izdanaka, konačnog broja prisutnih biljaka ili 25-postotno ili 50-postotno povećanje vidljivih oštećenja daje EC_{25}/ER_{25} odnosno EC_{50}/ER_{50}).

Nicanje: pojava koleoptila ili kotiledona iznad površine tla.

Formulacija: komercijalno formulirano sredstvo koje sadržava aktivnu tvar (aktivni sastojak), poznato i kao konačni pripravak ([1]) ili tipični proizvod za krajnju uporabu (eng. *typical end-use product* (TEP)).

LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom): najniža koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je uočen učinak. U ovom ispitivanju koncentracija koja odgovara LOEC-u ima statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar zadanog razdoblja izloženosti u usporedbi s kontrolom i veća je od vrijednosti NOEC-a.

Biljke koje ne pripadaju ciljanoj skupini: biljke izvan područja na kojemu se nalaze ciljane biljke. Kad je riječ o sredstvima za zaštitu bilja, to se obično odnosi na biljke izvan područja na kojemu se provodi tretiranje.

NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka): najviša koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj nije uočen nikakav učinak. U ovom ispitivanju koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar zadanog razdoblja izloženosti u usporedbi s kontrolom.

Fitotoksičnost: štetna odstupanja (prema izmjerenim vrijednostima ili vizualnoj procjeni) od normalnog izgleda i načina rasta biljaka koja se javljaju kao reakcija na određenu kemikaliju.

Ponavljanje: pokusna jedinica koja predstavlja kontrolnu skupinu i/ili skupinu koja se tretira. U ovom se ispitivanju uzgojna posuda definira kao ponavljanje.

Vizualna procjena: ocjenjivanje vidljivih oštećenja na temelju promatranja sklopa i vigora biljaka, deformacija, kloroze, nekroze i cjelokupnog izgleda u usporedbi s kontrolom.

Ispitivana kemikalija: bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

([1]) Konačni pripravak: formulirano sredstvo koje sadržava aktivnu kemikaliju (aktivni sastojak) i prodaje se u trgovini.

▼**M6**

Dodatak 2.

Popis vrsta koje se obično upotrebljavaju u ispitivanjima na biljkama

Porodica	Vrsta	Uobičajeni nazivi
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Mrkva
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Suncokret
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Zelena salata
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Gorušica bijela
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris var. chinensis*	Kineski kupus
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Uljana repica
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea var. capitata*	Kupus
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Postrna repa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Vrtni borovnjak
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Rotkvica
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Šećerna repa
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Krastavac
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja za zrno
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungo grah
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Grah
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Grašak
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Piskavica (grčka djetelina)
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Smiljkita roškasta
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Djetelina crvena
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Grahorica jara
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Lan
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Heljda
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Rajčica

▼**M6**

Porodica	Vrsta	Uobičajeni nazivi
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Luk
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Zob
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Ječam
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Ljulj engleski
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Riža
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Raž
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Stočni sirak
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Pšenica
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Kukuruz

▼M6

Dodatak 3.

Popis mogućih nepoljoprivrednih vrsta

Vrste koje je prema OECD-u moguće upotrebljavati za ispitivanje toksičnosti za bilje

Napomena: U sljedećoj su tablici navedeni podaci za 52 nepoljoprivredne vrste (kod svakog je unosa u zagradama navedeno upućivanje na literaturu). Navedene stope nicanja uzete su iz objavljene literature i služe samo za opću orijentaciju. Pojedinačno iskustvo može varirati ovisno o izvoru sjemena i drugim faktorima.

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek (1) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast (2)	Dubina sadnje (mm) (3)	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) (4)	Posebna obrada (5)	Test toksičnosti (6)	Dobavljači sjemena (7)	Ostala upućivanja (8)
APIACEAE *Torilis japónica* (kimljen divlji)	J, D poremećena područja, živice, pašnjaci (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	hladna stratifikacija (7, 14, 18, 19), može biti potrebno dozrijevanje (19), klijanje inhibirano tamom (1, 19), nikakva posebna obrada (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (tratinčica)	V travnjaci, oranice, ledine (16, 19)	0,09 – 0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	zračenje ne utječe na klijanje (18, 19), nikakva posebna obrada (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (različak)	J polja, uz ceste, otvorena staništa (16)	4,1 – 4,9 (4, 14)	L = D (14)	0 – 3 (2, 4, 14)	14 – 21 100 %) (14)	nikakva posebna obrada (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (crna zečina)	V polja, uz ceste, otvorena staništa (16, 19)	2,4 – 2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	može biti potrebno dozrijevanje (18, 19), klijanje inhibirano tamom (19), nikakva posebna obrada (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (pravi oman)	V vlažna, poremećena mjesta (16)	1 – 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		nikakva posebna obrada (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
Leontodon hispidus (lavlji zub)	V polja, uz ceste, poremećena područja (16, 19)	0,85 – 1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (17, 18, 19), nikakva posebna obrada (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (crnooka pupavica)	D, V poremećena područja (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	nikakva posebna obrada (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (gustocvjetna zlatnica)	V pašnjaci, otvorena područja (16)	0,06 – 0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14 – 21 (11)	pomiješati s jednakom količinom pijeska i namakati u 500 ppm GA 24 sata (11), nikakva posebna obrada (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (dikica)	J polja, otvorena staništa (16)	25 – 61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		klijanje može biti inhibirano tamom (1), namakati u toploj vodi 12 sati (29)	PRE i POST (31)	A	
Xanthium spinosum (trnovita dikica)	J otvorena staništa (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikacija (14), nikakva posebna obrada (6)	PRE i POST (6)	A	
Xanthium strumarium (obična dikica)	J polja, otvorena staništa (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		nikakva posebna obrada (6, 14, 21)	PRE i POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (livadna režuha)	V polja, uz ceste, livade (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19), nikakva posebna obrada (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (drijemnina)	V (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	može biti potrebno dozrijevanje (18), nikakva posebna obrada (5, 14, 15, 22 – 26)	POST (5, 15, 22 – 26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (bijela loboda)	J rubovi polja, poremećena područja (16, 19)	0,7 – 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	obrada se razlikuje ovisno o boji sjemena (19), dormantnost pri suhom skladištenju (19), klijanje inhibirano tamom (1, 18, 19), hladna stratifikacija (18), nikakva posebna obrada (14, 34)	PRE i POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (rupičasta pljuskavica)	V polja, oranice, otvorena staništa (16, 19)	0,1 – 0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (1, 18, 19), nikakva posebna obrada (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (vrtni slak)	J uz ceste, otvorena staništa, kukuruzna polja (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10 – 20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	zračenje ne utječe na klijanje (1), nikakva posebna obrada (6, 21)	PRE i POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (okruglasti oštrik)	V oranice, pašnjaci, uz ceste (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10 – 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	klijanje inhibirano tamom (1), nikakva posebna obrada (6, 10, 14)	PRE i POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (smiljkita roškasta)	V travnata područja, uz ceste, otvorena staništa (16, 19)	1 – 1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikacija (14, 19), zračenje ne utječe na klijanje (18, 19), nikakva posebna obrada (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
Senna obtusifolia (sena)	J vlažne šume (16)	23 – 28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10 – 20 (6, 9)		namakati sjeme u vodi 24 sata (9), skarifikacija (14), vijabilnost sjemena razlikuje se ovisno o boji (1), nikakva posebna obrada (6)	POST (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (konoplja)	J aluvijalno tlo (16)	11 – 13 (9, 14)	L > D (9)	10 – 20 (9, 21)		namakati sjeme u vodi 24 sata (9), zračenje ne utječe na klijanje (1), nikakva posebna obrada (21)	PRE i POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (djetelina crvena)	V polja, uz ceste, oranice (16, 19)	1,4 – 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikacija (14, 18), može biti potrebno dozrijevanje (19), zračenje ne utječe na klijanje (1, 19), nikakva posebna obrada (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (prava srčenica)	V otvorena područja (16)	0,75 – 1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		nikakva posebna obrada (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (klasasta metvica)	V vlažna područja (16)	2,21 (4)		0 (4)		nikakva posebna obrada (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (prava mačja metvica)	V poremećena područja (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		nikakva posebna obrada (2, 4, 14)	POST (2, 4)	F	

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
Prunella vulgaris (obična celinščica)	V oranice, travnata područja, poremećena mjesta (16, 19)	0,58 – 1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19), veća klijavost kod većih sjemenki (1), nikakva posebna obrada (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (ljekoviti čistac)	V travnjaci, rubovi polja (19)	14 – 18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	nikakva posebna obrada (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Teofrastov mračnjak)	J polja, otvorena staništa (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikacija (14), nikakva posebna obrada (5, 10, 21)	PRE i POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (/)	J polja, uz ceste (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		skarifikacija (14), zračenje ne utječe na klijanje (1), nikakva posebna obrada (6, 21)	PRE i POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (mak turčinak)	J polja, oranice, poremećena mjesta (16, 19)	0,1 – 0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	hladna stratifikacija i skarifikacija (1, 19, 32), nikakva posebna obrada (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (obična rosulja)	tratine, pašnjaci (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	klijanje inhibirano tamom (1, 17 – 19), nikakva posebna obrada (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (poljski repak)	J polja, otvorena staništa (16)	0,9 – 1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikacija (14), tretirati sa 101 mg/l KNO_3 (14), topla stratifikacija (1) klijanje inhibirano tamom (1) nikakva posebna obrada (34)	PRE i POST (28, 34)	A	32

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek (1) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast (2)	Dubina sadnje (mm) (3)	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) (4)	Posebna obrada (5)	Test toksičnosti (6)	Dobavljači sjemena (7)	Ostala upućivanja (8)
Avena fatua (štura zob)	J obrađena područja, otvorena staništa (16)	7 – 37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 – 20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikacija (7, 32), tama inhibira klijanje (1), hladna stratifikacija (1, 18), nikakva posebna obrada (6, 10, 14)	PRE i POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (krovni ovsik)	J polja, uz ceste, oranice (16)	0,45 – 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		razdoblje dozrijevanja (1, 7, 32), klijanje inhibirano svjetlošću (1), nikakva posebna obrada (14)	PRE i POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (livadni krestac)	V polja, uz ceste, otvorena staništa (16, 19)	0,5 – 0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	zračenje ne utječe na klijanje (19), nikakva posebna obrada (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (ljubičasta svračica)	J polja, ledine, otvorena staništa (16)	0,52 – 0,6 (14, 30)	L = D (14)	10 – 20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikacija, hladna stratifikacija i dozrijevanje (1, 7, 14, 32), tretirati sa 101 mg/L KNO_3 (14), klijanje inhibirano tamom (1), nikakva posebna obrada (21)	PRE i POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (kokošje proso)	J (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 – 20 (7, 21)		skarifikacija (7, 32), zračenje ne utječe na klijanje (1), nikakva posebna obrada (3, 14, 21)	PRE i POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (kanadska pirika)	V riječne obale, poremećena područja (16)	4 – 5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14 – 28 (11)	nikakva posebna obrada (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (livadna vlasulja)	V polja, vlažna područja (16, 19)	1,53 – 2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	nikakva posebna obrada (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
Hordeum pusilium (mali ječam)	J pašnjaci, uz ceste, otvorena staništa (16)	3,28 (14)				topla stratifikacija (1), zračenje ne utječe na klijanje (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense (mačji repak)	V pašnjaci, oranice, poremećena mjesta (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0 – 10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	klijanje inhibirano tamom (19), zračenje ne utječe na klijanje (17), nikakva posebna obrada (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (povijajuća heljda)	J otvorena staništa, uz ceste (16)	5 – 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0 – 2 (4, 29)		hladna stratifikacija 4 – 8 tjedana (1, 2, 4, 20, 29), zračenje ne utječe na klijanje (1)	PRE i POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (kiseličasti dvornik)	J vlažno tlo (16)	1,8 – 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	zračenje ne utječe na klijanje (1), klijanje inhibirano tamom (18), hladna stratifikacija (1), nikakva posebna obrada (5)	PRE i POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum(/)	J polja, otvorena staništa (16)	3,6 – 7 (14, 29)		2 (29)		hladna stratifikacija 4 tjedana na 0 – 5 °C (1, 29), klijanje inhibirano tamom (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (pjegasti dvornik)	J poremećena područja, oranice (16, 19)	2,1 – 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikacija, hladna stratifikacija, tretiranje s GA (14), hladna stratifikacija, dozrijevanje (17 – 19) klijanje inhibirano tamom (19) nikakva posebna obrada (13)	POST (13)	A	32

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek ([1]) i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast ([2])	Dubina sadnje (mm) ([3])	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) ([4])	Posebna obrada ([5])	Test toksičnosti ([6])	Dobavljači sjemena ([7])	Ostala upućivanja ([8])
Rumex crispus (kovrčava kiselica)	V oranice, uz ceste, otvorena područja (16, 19)	1,3 – 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	klijanje inhibirano tamom (18, 19), može biti potrebno dozrijevanje (18), nikakva posebna obrada (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (modra krivičica)	J oranice, otvorena područja, poremećena mjesta (16, 19)	0,4 – 0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	hladna stratifikacija, tretiranje s GA (1,14, 18, 19, 32), za klijanje je potrebna svjetlost (1), nikakva posebna obrada (2, 4)	POST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (žabnjak ljutić)	V oranice, uz ceste, otvorena područja (16, 19)	1,5 – 2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 – 56 (19, 29)	nikakva posebna obrada (5, 14, 22, 24 – 26)	POST (5, 22, 24 – 26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (pravi blaženak)	V živice, vlažna područja (16, 19)	0,8 – 1,5 14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19), topla stratifikacija (1), nikakva posebna obrada (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (čekinjasta broćika)	J oranice, vlažna područja, poremećena mjesta (16, 19)	7 – 9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	hladna stratifikacija (1, 18, 19), zračenje ne utječe na klijanje (18, 19), svjetlost inhibira klijanje (1), nikakva posebna obrada (6, 14)	PRE i POST (6, 28)	A	32

▼M6

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni hrvatski naziv)	Životni vijek [1] i stanište	Težina sjemena (mg)	Fotoperiod za klijanje ili rast [2]	Dubina sadnje (mm) [3]	Vrijeme potrebno za klijanje (u danima) [4]	Posebna obrada [5]	Test toksičnosti [6]	Dobavljači sjemena [7]	Ostala upućivanja [8]
Galium mollugo (livadna broćika)	V živice, otvorena područja (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		nikakva posebna obrada (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (grimizni naprstak)	J, V, živice, otvorena područja (16, 19)	0,1 – 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (1, 17 – 19), nikakva posebna obrada (4, 22 – 26)	POST (4, 22 – 26)	D, G, F	
Veronica persica (perzijska čestoslavica)	J oranice, otvorena područja, poremećena mjesta (16, 19)	0,5 – 0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19), hladna stratifikacija (18), nikakva posebna obrada (14)	PRE i POST (28)	A	32

([1]) J = jednogodišnja biljka D = dvogodišnja biljka V = višegodišnja biljka.
([2]) Upućivanja 11, 14 i 33 odnose se na omjer svjetlosti (L) i tame (D) potreban za poticanje klijanja. Upućivanja 3, 6, 9, 10, 13 i 20 odnose se na uvjete uzgoja u staklenicima.
([3]) 0 mm ukazuje na to da je sjeme posijano na površinu tla ili da mu je potrebna svjetlost da bi proklijalo.
([4]) Navedeni brojevi označuju broj dana u kojima je sjeme proklijalo prema navedenoj literaturi, npr. klijanje u tri dana (50 %) (literatura pod brojem 19).
([5]) Podaci o trajanju dozrijevanja i/ili stratifikaciji nisu uvijek dostupni. Osim kad je potreban hladni tretman, temperaturni uvjeti nisu navedeni jer je pri ispitivanju u stakleniku kontrola temperature ograničena. Većina sjemena proklijat će uz normalne fluktuacije temperatura koje se javljaju u staklenicima.
([6]) Ukazuje na to da je vrsta upotrijebljena u ispitivanju toksičnosti za bilje primjenom herbicida prije nicanja (PRE) i/ili nakon nicanja (POST).
([7]) Navodi se primjer ili primjeri komercijalnih dobavljača sjemena.
([8]) Navodi se dodatna proučena literatura.

▼**M6**

Navedeni dobavljači sjemena

Oznaka dobavljača	Podaci o dobavljaču
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLESKA +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 SAD (727) 344 – 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 KANADA (519) 586 – 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 SAD (303) 431 – 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 SAD (800) 873 – 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLESKA +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 KANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

CITIRANA LITERATURA

(1) Baskin, C. C. i Baskin, J. M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L. G. i Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H. B., Peart, T., Batchelor, P. S., i Maguire, R. J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N. i Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G. i Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R. A. i Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. U: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang i M.A. Lewis, ur. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. str. 197. – 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D. D. i Hoffman, M. L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A. R., Tutin, T. G. i Warburg, E. F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3. izdanje. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P. A. i Griffin, J. L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J. F. H. i Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. str. 151. – 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Osobna komunikacija. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J. S., Johnson, F. L. i McFarlane, J. C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J. S., Pfleeger, T. G., Ratsch, H.C. i Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R. M. i Dickie, J. B. 2004. Seed Information Database (izdanje 6.0, listopad 2004.) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H. A. i Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2. izdanje, New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J. P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M. A. G., Neal, A. M. i Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J. P., Hodgson, J. G. i Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T. E., King, C. A. i Oliver, L. R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R. H., Williams, C. T., Frost, A. J. i Plant, R. A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R. H., Frost, A. J. & Plant, R. A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R. H., Frost, A. J. i Plant, R. A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R. H., Frost, A. J., Plant, R. A. i Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R. H. i Frost, A. J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E. J. P. i Bernie, J. E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. str. 1021. – 1028.

(28) McKelvey, R. A., Wright, J. P. i Honegger, J. L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Osobna komunikacija. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, verzija3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) US EPA. 1999. One-Liner Database. [US EPA/Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R. H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. i Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Osobna komunikacija.

(34) Zwerger, P. i Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Dodatak 4.

Primjeri odgovarajućih uvjeta rasta za određene poljoprivredne vrste

Pokazalo se da su sljedeći uvjeti prikladni za deset poljoprivrednih vrsta i mogu služiti i kao smjernica za ispitivanja u uzgojnim komorama na nekim drugim vrstama:

Koncentracija ugljičnog dioksida: 350 ± 50 ppm;

Relativna vlažnost: 70 ± 5 % u razdobljima svjetla i 90 ± 5 % u razdobljima mraka;

Temperatura: 25 ± 3 °C tijekom dana, 20 ± 3 °C tijekom noći;

Fotoperiod: 16 sati svjetla / osam sati mraka, uz pretpostavku prosječne valne duljine od 400 do 700 nm;

Svjetlo: osvjetljenje od 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, mjereno na vrhu nadzemnog dijela biljke.

Predmetne su poljoprivredne vrste:

— rajčica (*Solanum lycopersicon*),

— krastavac (*Cucumis sativus*),

— zelena salata (*Lactuca sativa*),

— soja (*Glycine max*),

— kupus (*Brassica oleracea var. capitata*),

— mrkva (*Daucus carota*),

— zob (*Avena sativa*),

— višegodišnji ljulj (*Lolium perenne*),

— kukuruz (*Zea mays*),

— luk (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA ENHITREJAMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 220 (2004.). Namijenjena je procjeni učinaka kemikalija na reprodukcijsku uspješnost crva iz porodice enhitreja, *Enchytraeus albidus* Henle 1873., u tlu. Uglavnom se temelji na metodi koju je razvio Umweltbundesamt (Njemačka) (1) koja bila ispitana u prstenastom testu (2). Razmotrene su i druge metode ispitivanja toksičnosti kemikalija za enhitreje i gujavice (3) (4) (5) (6) (7) (8).

POČETNA RAZMATRANJA

2. Kolutićavci koji žive u tlu i pripadaju rodu *Enchytraeus* ekološki su relevantne vrste za ekotoksikološka ispitivanja. Iako enhitreji često nastanjuju tla koja sadržavaju gujavice, njima isto tako obiluju i mnoga tla u kojima nema gujavica. Enhitreji se mogu upotrebljavati u laboratorijskim ispitivanjima, kao i u poluterenskim i terenskim istraživanjima. S praktične točke gledišta, enhitrejima je lako rukovati i lako ih je uzgajati te im je generacijsko vrijeme kraće nego kod gujavica. Stoga ispitivanje reproduktivne toksičnosti na erhitrejama traje samo četiri do šest tjedana, dok kod gujavica (*Eisenia fetida*) traje osam tjedana.

3. Osnovne informacije o ekologiji i ekotoksikologiji enhitreja u kopnenom okolišu mogu se pronaći u literaturi (9) (10) (11) (12).

NAČELO ISPITIVANJA

4. Odrasli crvi enhitreja izlažu se nizu koncentracija ispitivane kemikalije umiješane u umjetno tlo. Ispitivanje se može podijeliti u dvije faze: (a) ispitivanje za određivanje raspona, koje se provodi u slučaju kad nema dovoljno informacija i u kojem je smrtnost glavna krajnja točka koja se procjenjuje nakon dvotjedne izloženosti te (b) glavno ispitivanje reproduktivne toksičnosti u kojem se procjenjuje ukupan broj mladih po roditeljskoj životinji i preživljavanje roditeljskih životinja. Glavno ispitivanje traje šest tjedana. Nakon prva tri tjedna odrasli se crvi vade i bilježe se morfološke promjene. Nakon dodatna tri tjedna utvrđuje se broj potomaka koji su se izvalili iz kokona što su ih proizvele odrasle jedinke. Reprodukcijska uspješnost životinja izloženih ispitivanoj kemikaliji uspoređuje se s kontrolom odnosno kontrolama kako bi se odredila (i) najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) i/ili (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) primjenom regresijskog modela kako bi se procijenila koncentracija koja bi izazvala x-postotno smanjenje reprodukcijske uspješnosti. Ispitne koncentracije moraju obuhvaćati EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako da se EC_x potom može dobiti interpolacijom, a ne ekstrapolacijom.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

5. Po mogućnosti moraju biti poznati topljivost u vodi, log K_{ow}, koeficijent razdjeljenja između tla i vode (npr. poglavlje C.18. ili C.19. ovog Priloga) te tlak para ispitivane kemikalije. Poželjno je imati i dodatne informacije o sudbini ispitivane kemikalije u tlu, kao što su brzina fotolize i hidrolize.

6. Ova se ispitna metoda može upotrebljavati za kemikalije koje su topljive, kao i za one koje nisu topljive u vodi. Ovisno o tome, razlikovat će se i način primjene ispitivane kemikalije. Ova ispitna metoda nije primjenljiva na hlapljive kemikalije, tj. kemikalije za koje su Henryjeva konstanta ili koeficijent razdjeljenja između zraka i vode veći od jedan ili kemikalije čiji je tlak para veći od 0,0133 Pa pri 25 °C.

▼M6

VALJANOST ISPITIVANJA

7. Da bi ispitivanje bilo valjano, kontrole moraju zadovoljavati sljedeće provedbene kriterije:

— smrtnost odraslih jedinki ne smije biti veća od 20 % na kraju ispitivanja za određivanje raspona te nakon prva tri tjedna ispitivanja reproduktivne toksičnosti,

— pod pretpostavkom da je ispitivanje započeto s 10 odraslih jedinki po posudi, na kraju ispitivanja mora biti prosječno najmanje 25 mladih jedinki po posudi.

— koeficijent varijacije oko srednje vrijednosti broja mladih jedinki ne smije biti veći od 50 % na kraju ispitivanja reproduktivne toksičnosti.

Ako ispitivanje ne ispuni navedene kriterije valjanosti, potrebno ga je prekinuti, osim ako postoji opravdanje za njegov nastavak. To je opravdanje potrebno navesti u izvješću o ispitivanju.

REFERENTNA KEMIKALIJA

8. Referentnu kemikaliju potrebno je ispitivati u redovitim vremenskim razmacima ili je se može uključiti u svaki test kako bi se provjerilo da se odgovor ispitnih organizama nije značajno promijenio tijekom vremena. Prikladna je referentna kemikalija karbendazim, za koji je dokazano da utječe na preživljavanje i razmnožavanje enhitreja (13) (14), a mogu se upotrebljavati i druge kemikalije za koje su podaci o toksičnosti dobro poznati. Formulacija karbendazima, poznata pod trgovačkim nazivom Derosal ™ koju isporučuje AgrEvo Company (Frankfurt, Njemačka) i koja sadržava 360 g/l (32,18 %) aktivnog sastojka, upotrijebljena je u prstenastom ispitivanju (2). Vrijednost EC_{50} za razmnožavanje koja je utvrđena prstenastim ispitivanjem bila je u rasponu od 1,2 ± 0,8 mg aktivnog sastojka (a. s.) / kg suhe mase (2). Ako se u ispitni niz uključi pozitivan toksični standard, upotrebljava se jedna koncentracija i jednak broj ponavljanja kao i kod kontrola. Za karbendazim se preporučuje ispitivanje 1,2 mg a. s. / kg suhe mase (ispitano u obliku tekuće formulacije).

OPIS ISPITIVANJA

Oprema

9. Ispitne posude moraju biti od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Prikladne su staklenke (npr. zapremina: 0,20 – 0,25 l; promjer: ≈ 6 cm). Posude moraju imati proziran poklopac (npr. od stakla ili polietilena) koji je tako napravljen da smanjuje isparavanje vode i istodobno omogućuje izmjenu plinova između tla i atmosfere. Poklopci moraju biti prozirni da omoguće prolaz svjetla.

10. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema, a posebno:

— ormar za sušenje,

— stereomikroskop,

— pH-metar i fotometar,

— prikladne precizne vage,

— odgovarajuća oprema za kontrolu temperature,

— odgovarajuća oprema za kontrolu vlage (nije nužna ako ispitne posude imaju poklopce),

— inkubator ili manja prostorija opremljena klimatizacijskim uređajem,

— pincete, kuke ili petlje,

— kada za razvijanje fotografija.

Pripremanje umjetnog tla

11. U ovom se ispitivanju upotrebljava umjetno tlo (5) (7) sljedećeg sastava (na bazi suhe mase, osušene do stalne mase pri 105 °C):

▼**M6**

— 10 % sphagnum treseta, osušenog na zraku i fino usitnjenog (prihvatljive su čestice veličine 2 ± 1 mm); prije uporabe preporučljivo je provjeriti je li tlo koje je pripremljeno od svježe serije treseta prikladno za uzgoj crva,

— 20 % kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %),

— približno 0,3 do 1,0 % kalcijeva karbonata ($CaCO_3$, u prahu, analitičkog stupnja čistoće) da bi se dobio pH od 6,0 ± 0,5; količina kalcijeva karbonata koju je potrebno dodati može u prvom redu ovisiti o kvaliteti/prirodi treseta,

— oko 70 % kremenog pijeska sušenog na zraku (ovisno o potrebnoj količini $CaCO_3$), pretežno finog pijeska s više od 50 % čestica veličine između 50 i 200 mikrona.

Prije nego što se umjetno tlo upotrijebi u glavnom ispitivanju, preporučljivo je dokazati da je takvo tlo prikladno za uzgoj crva i da omogućuje ispunjenje kriterija valjanosti ispitivanja. Posebno se preporučuje izvršiti takvu provjeru kako bi se osiguralo da uspješnost ispitivanja neće biti ugrožena ako se smanji sadržaj organskog ugljika u umjetnom tlu, npr. smanjenjem sadržaja treseta na 4 do 5 % i odgovarajućim povećanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjenjem sadržaja organskog ugljika može se smanjiti mogućnost adsorpcije ispitivane kemikalije u tlo (organski ugljik) te se može povećati dostupnost ispitivane kemikalije crvima. Pokazalo se da *Enchytraeus albidus* može ispuniti kriterije valjanosti koji se odnose na razmnožavanje kada se ispituje u tlima u kojima je sadržaj organskog ugljika manji od navedenog (npr. 2,7 %) (15), a iskustvo, iako ograničeno, pokazuje da se to može postići i s umjetnim tlom s 5 % treseta.

Napomena: Ako se u dodatnim ispitivanjima (npr. ispitivanjima višeg stupnja) upotrebljava prirodno tlo, isto je tako potrebno dokazati prikladnost tla i ispunjenje kriterija valjanosti ispitivanja.

12. Suhi sastojci tla temeljito se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijskoj miješalici). To treba učiniti najmanje tjedan dana prije početka ispitivanja. Izmiješano tlo potrebno je držati pohranjeno dva dana kako bi se uravnotežila/stabilizirala kiselost. Za određivanje pH-vrijednosti upotrebljava se smjesa tla s otopinom 1 M kalijeva klorida (KCl) ili 0,01 M kalcijeva klorida ($CaCl_2$) u omjeru 1: 5 (vidjeti (16) i Dodatak 3.). Ako kiselost tla nije unutar zahtijevanog raspona (vidjeti stavak 11.), može se prilagoditi dodavanjem odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ako je tlo previše lužnato, može se prilagoditi dodavanjem smjese iz stavka 11., ali bez $CaCO_3$.

13. Maksimalni vodni kapacitet (WHC) umjetnog tla određuje se u skladu s postupcima opisanima u Dodatku 2. Jedan ili dva dana prije početka ispitivanja suho se umjetno tlo vlaži dodavanjem dovoljno deionizirane vode da bi se dobilo otprilike pola konačnog sadržaja vode, tj. 40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta. Na početku ispitivanja prethodno navlaženo tlo dijeli se na onoliko dijelova koliko ima ispitnih koncentracija (prema potrebi uključujući i referentnu kemikaliju) i kontrola koje se upotrebljavaju za

▼M6

ispitivanje. Sadržaj vlage prilagođava se na 40 do 60 % maksimalnog WHC-a dodavanjem otopine ispitivane kemikalije i/ili dodavanjem destilirane ili deionizirane vode (vidjeti stavke od 19. do 21.). Sadržaj vlage određuje se na početku i na kraju ispitivanja (sušenjem do stalne mase na 105 °C) i trebao bi biti unutar optimalnog raspona za preživljavanje crva. Vlažnost tla može se ugrubo procijeniti laganim gnječenjem rukom: ako je sadržaj vlage ispravan, među prstima bi se trebale pojaviti kapljice vode.

Odabir i priprema ispitnih životinja

14. Preporučena je ispitna vrsta *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (bijeli crv), koja pripada porodici *Enchytraeidae* (red *Oligochaeta*, koljeno *Annelida*). *E. albidus* jedna je od najvećih enhitreja, kod koje su zabilježeni primjerci i do 35 mm duljine (17) (18). *E. albidus* rasprostranjena je diljem svijeta i može se naći u morskim, slatkovodnim i kopnenim staništima, uglavnom u organskoj tvari u raspadu (morska trava, kompost), a rijetko na livadama (9). Njezina velika ekološka tolerancija i neke morfološke varijacije mogući su znak postojanja više podvrsta.

15. *E. albidus* dostupna je u trgovinama kao hrana za ribe. Treba provjeriti je li kultura onečišćena drugom, obično manjom vrstom (1) (19). Ako dođe do onečišćenja, sve crve treba oprati vodom u Petrijevoj zdjelici. Potom se veliki primjerci vrste *E. albidus* biraju (stereomikroskopom) za početak nove kulture, a svi se ostali crvi bacaju. *E. albidus* može se lako uzgajati u vrlo različitim organskim materijalima (vidjeti Dodatak 4.). *E. albidus* ima kratak životni ciklus jer zrelost postiže u dobi između 33 dana (na 18 °C) i 74 dana (na 12 °C). Za ispitivanje se upotrebljavaju samo kulture koje su najmanje pet tjedana (jedan naraštaj) držane u laboratoriju bez problema.

16. Prikladne su i druge vrste iz roda *Enchytraeus*, npr. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 ili *E. crypticus* Westheide i Graefe 1992. (vidjeti Dodatak 5.). Ako se upotrebljavaju druge vrste *Enchytraeus*, treba ih jasno identificirati i u izvješću je potrebno navesti obrazloženje za odabir te vrste.

17. Životinje koje se upotrebljavaju u ispitivanjima odrasli su crvi. Moraju imati jajašca (bijele točkice) u području kliteluma i biti otprilike iste veličine (dugi oko 1 cm). Sinkronizacija uzgojne kulture nije potrebna.

18. Ako se enhitreje ne uzgajaju u istom tipu tla i u istim uvjetima (uključujući hranjenje) koji se primjenjuju za glavno ispitivanje, moraju proći razdoblje aklimatizacije od najmanje 24 sata do tri dana. Za početak je potrebno aklimatizirati veći broj odraslih životinja nego što ih je potrebno za provođenje ispitivanja, kako bi se mogli odbaciti primjerci koji su oštećeni ili nisu prikladni zbog drugih razloga. Na kraju razdoblja aklimatizacije za ispitivanje se odabiru samo crvi koji imaju jajašca i ne pokazuju anomalije u ponašanju (npr. pokušaj bijega iz tla). Crvi se pažljivo vade s pomoću draguljarske pincete, kukice ili petlje te se stavljaju u Petrijevu zdjelicu koja sadržava malu količinu svježe vode. U tu je svrhu poželjno upotrijebiti obrađenu vodu, kako se predlaže u poglavlju C.20. ovog Priloga (Test reproduktivne toksičnosti na vrsti *Daphnia magna*) jer bi deionizirana, demineralizirana ili vodovodna voda mogla biti štetna za crve. Crvi se pregledavaju stereomikroskopom te se odbacuju svi koji nemaju jajašca. Treba se pobrinuti da budu uklonjene sve grinje i skokuni kojima su možda zaražene kulture. Zdravi crvi koji se neće upotrijebiti za ispitivanje vraćaju se u matičnu kulturu.

▼M6

Priprema ispitnih koncentracija

Ispitivana kemikalija topljiva u vodi

19. Otopina ispitivane kemikalije priprema se u deioniziranoj vodi u količini dovoljnoj za sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Preporučuje se upotrijebiti odgovarajuću količinu vode da se postigne potreban sadržaj vlage, tj. 40 do 60 % maksimalnog WHC-a (vidjeti stavak 13.). Svaka se otopina ispitivane kemikalije temeljito izmiješa s jednom šaržom prethodno navlaženog tla prije nego što se uvede u ispitnu posudu.

Ispitivana kemikalija netopljiva u vodi

20. Ispitivana kemikalija koja nije topljiva u vodi, ali je topljiva u organskim otapalima, može se otopiti u najmanjoj mogućoj količini prikladnog nosača (npr. acetona). Treba upotrijebiti samo hlapljiva otapala. Nosač se poprska po maloj količini, npr. 2,5 g, finog kremenog pijeska ili se pomiješa s njom. Nosač se uklanja isparavanjem u digestoru najmanje jedan sat. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije dodaje prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa nakon dodavanja odgovarajuće količine deionizirane vode da bi se dobio potreban sadržaj vlage. Konačna se smjesa unosi u ispitne posude.

21. Za kemikalije koje su slabo topljive u vodi i u organskim otapalima, 2,5 g fino usitnjenog kremenog pijeska po ispitnoj posudi pomiješa se s količinom ispitivane kemikalije za dobivanje željene ispitne koncentracije. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije doda prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa nakon dodavanja odgovarajuće količine deionizirane vode da bi se dobio potreban sadržaj vlage. Konačna se smjesa podijeli na ispitne posude. Navedeni se postupak ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a pripremi se i odgovarajuća kontrola.

22. Kemikalije se obično ne bi smjele ispitivati u koncentracijama većim od 1 000 mg/kg suhe mase tla. Međutim, određeni posebni ispitni ciljevi mogu zahtijevati primjenu viših koncentracija.

PROVEDBA ISPITIVANJA

Ispitne skupine i kontrole

23. Za svaku se ispitnu koncentraciju u ispitnu posudu stavlja količina ispitnog tla koja odgovara količini od 20 g suhe mase (vidjeti stavke od 19. do 21.). Pripremaju se i kontrole bez ispitne kemikalije. U svaku se posudu dodaje hrana u skladu s postupcima opisanima u stavku 29. Deset crva nasumce se rasporedi u svaku ispitnu posudu. Crvi se pažljivo prenesu u svaku posudu i stavljaju na površinu tla s pomoću npr. draguljarske pincete, kukice ili petlje. Broj ponavljanja za ispitne koncentracije i kontrole ovisi o primijenjenom planu ispitivanja (vidjeti stavak 34.). Ispitne se posude nasumce rasporede po inkubatoru i svakog se tjedna nasumce premještaju.

24. Ako se za primjenu ispitivane kemikalije upotrebljava nosač, uz ispitni je niz potrebno uključiti i jedan kontrolni niz koji sadržava kremeni pijesak poprskan otapalom ili pomiješan s njim. Koncentracija otapala ili dispergenta mora biti ista kao u ispitnim posudama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju. Kontrolni niz koji sadržava dodatni kremeni pijesak (2,5 g po posudi) potrebno je uključiti za kemikalije koje je potrebno primijeniti u skladu s postupcima opisanima u stavku 21.

▼M6

Uvjeti ispitivanja

25. Ispitna temperatura iznosi 20 ± 2 °C. Kako bi se spriječilo bježanje crva iz tla, ispitivanje se provodi u kontroliranim ciklusima izmjene svjetlosti i tame (po mogućnosti 16 sati svjetla i osam sati tame), uz osvjetljenje od 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda.

26. Radi provjere vlažnosti tla, posude se važu na početku ispitivanja i potom jednom tjedno. Gubitak težine nadoknađuje se dodavanjem odgovarajuće količine deionizirane vode. Valja napomenuti da se gubitak vode može smanjiti održavanjem visoke vlažnosti zraka (> 80 %) u inkubatoru.

27. Sadržaj vlage i pH potrebno je izmjeriti na početku i na kraju ispitivanja za određivanje raspona i glavnog ispitivanja. Mjerenja je potrebno izvršiti u tretiranim (sve koncentracije) i kontrolnim uzorcima tla koji su pripremljeni i održavani na isti način kao ispitne kulture, ali ne sadržavaju crve. Tim uzrocima tla hranu je potrebno dodati samo na početku ispitivanja kako bi se omogućila mikrobna aktivnost. Količina dodane hrane mora biti jednaka količini dodanoj ispitnim kulturama. Tijekom ispitivanja u te posude više nije potrebno dodavati hranu.

Hranjenje

28. Može se upotrebljavati hrana koja omogućuje održavanje populacije enhitreja. Pokazalo se da su prikladna hrana zobene pahuljice, po mogućnosti obrađene u autoklavu prije uporabe kako bi se spriječila kontaminacija mikroorganizmima (može se primijeniti i zagrijavanje).

29. Hrana se prvo daje tako da se 50 mg mljevenih zobenih pahuljica pomiješa s tlom u svakoj posudi prije unošenja crva. Potom se hrana daje jednom tjedno do 21. dana. Hrana se ne daje 28. dana, jer su u toj fazi odrasli crvi već uklonjeni, a mladim je jedinkama otada potrebno relativno malo dodatne hrane. Tijekom ispitivanja hranjenje se provodi tako da se u svaku posudu doda 25 mg mljevenih zobenih pahuljica, koje se pažljivo stavljaju na površinu tla kako se crvi ne bi oštetili. Kako bi se smanjio rast gljivica, zobene pahuljice treba zatrpati prekrivajući ih malom količinom tla. Ako hrana ostane nepojedena, porcije hrane treba smanjiti.

Plan ispitivanja za određivanje raspona

30. Ako je potrebno, provodi se ispitivanje za određivanje raspona s na primjer pet koncentracija ispitivane kemikalije: 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suhe mase tla). Dovoljno je jedno ponavljanje za svaki tretman i kontrolu.

31. Ispitivanje za određivanje raspona traje dva tjedna. Na kraju ispitivanja procjenjuje se smrtnost crva. Crv se evidentira kao mrtav ako ne reagira na mehanički podražaj na prednjem kraju. Osim podataka o smrtnosti, korisno je raspolagati i drugim podacima kako bi se mogla donijeti odluka o rasponu koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom ispitivanju. Stoga je osim bilježenja prisutnosti mladih jedinki potrebno zabilježiti i promjene u ponašanju odraslih jedinki (npr. nesposobnost ukopavanja u tlo; nepomično pripijanje uz staklenu stijenku ispitne posude) i u njihovoj morfologiji (npr. prisutnost otvorenih rana). Prisutnost mladih jedinki može se odrediti metodom bojenja koja je opisana u Dodatku 6.

32. Vrijednost LC_{50} može se približno odrediti izračunavanjem geometrijske sredine podataka o smrtnosti. Kod utvrđivanju raspona koncentracija za glavno ispitivanje polazi se od pretpostavke da su učinci na razmnožavanje manji od LC_{50} za faktor koji može iznositi do 10. Međutim, to je empirijski

▼M6

odnos koji u konkretnim slučajevima može biti drukčiji. Dodatna opažanja iz ispitivanja za određivanje raspona, kao što je prisutnost mladih jedinki, mogu omogućiti bolju prilagodbu raspona koncentracija ispitivane kemikalije koje će se upotrebljavati u glavnom ispitivanju.

33. Za precizno određivanje vrijednosti LC_{50} preporučuje se provođenje ispitivanja s najmanje četiri ponavljanja po svakoj koncentraciji ispitne kemikalije i odgovarajućim brojem koncentracija koje će izazvati najmanje četiri različita statistički značajna srednja odgovora pri tim koncentracijama. Ako je primjenljivo, i za kontrole se upotrebljava isti broj koncentracija i ponavljanja.

Plan glavnog testa reproduktivne toksičnosti

34. Predlažu se tri plana na temelju preporuka proizišlih iz prstenastog ispitivanja (2).

— Za određivanje NOEC-a potrebno je ispitati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 1,8.

— Za određivanje vrijednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) potrebno je ispitati najmanje pet koncentracija koje obuhvaćaju vrijednost EC_x kako bi se vrijednost EC_x mogla dobiti interpolacijom umjesto ekstrapolacijom. Preporučuju se najmanje četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i četiri kontrolna ponavljanja. Interval između koncentracija može se razlikovati, tj. može iznositi 1,8 ili manje za raspon koncentracija za koji se očekuje da će izazvati učinak te više od 1,8 kod viših i nižih koncentracija.

— Kombinirani pristup omogućuje određivanje i NOEC-a i EC_x. Potrebno je upotrijebiti osam ispitnih koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 1,8.

35. Potrebno je upotrijebiti deset odraslih crva po ispitnoj posudi (vidjeti stavak 23.). Hrana se dodaje u ispitne posude na početku ispitivanja i potom jednom tjedno (vidjeti stavak 29.) do uključivo 21. dana. Na 21. dan uzorci tla pažljivo se ručno pretražuju te se živi odrasli crvi promatraju i prebrojavaju i bilježe se promjene u njihovu ponašanju (npr. nesposobnost ukopavanja u tlo, nepomično pripijanje uz staklenu stijenku ispitne posude) i u njihovoj morfologiji (npr. otvorene rane). Svi se odrasli crvi potom uklanjaju iz ispitnih posuda i ispitnog tla. Ispitno tlo koje sadržava kokone inkubira se tri dodatna tjedna u istim ispitnim uvjetima, osim što se hranjenje provodi samo 35. dana (25 mg mljevenih zobenih pahuljica po posudi).

36. Nakon šest tjedana prebrojavaju se crvi izleženi iz kokona. Preporučuje se metoda bojenja bengalskim crvenilom (vidjeti Dodatak 6.), iako su se prikladnima pokazale i druge tehnike ekstrakcije i flotacije mokrim (ali ne toplinskim) postupkom (vidjeti Dodatak 6.) (4) (10) (11) (20). Preporučuje se bojenje bengalskim crvenilom jer ekstrakcija mokrim postupkom iz supstrata tla može biti onemogućena zbog zamućenja uzrokovanog suspendiranim česticama gline.

Granično ispitivanje

37. Ako se u ispitivanju za određivanje raspona ne uoče učinci pri najvećoj koncentraciji (tj. 1 000 mg/kg), test reproduktivne toksičnosti može se provesti kao granični test s 1 000 mg/kg kako bi se dokazalo da je NOEC za razmnožavanje veći od te vrijednosti.

▼M6

Sažetak i vremenski raspored ispitivanja

38. Faze ispitivanja mogu se sažeto prikazati kako slijedi:

Vrijeme	Ispitivanje za određivanje raspona	Glavno ispitivanje
Dan –7. ili ranije	— Pripremiti umjetno tlo (miješanje suhih sastojaka)	— Pripremiti umjetno tlo (miješanje suhih sastojaka)
Dan –5.	— Provjeriti pH-vrijednost umjetnog tla — Izmjeriti maksimalni WHC tla	— Provjeriti pH-vrijednost umjetnog tla — Izmjeriti maksimalni WHC tla
Dan –5. do –3.	— Razvrstati crve za aklimatizaciju	— Razvrstati crve za aklimatizaciju
Dan – 3. do 0.	— Aklimatizirati crve najmanje 24 sata	— Aklimatizirati crve najmanje 24 sata
Dan –1.	— Prethodno ovlažiti umjetno tlo i rasporediti ga u šarže	— Prethodno ovlažiti umjetno tlo i rasporediti ga u šarže
Dan 0.	— Pripremiti radne otopine — Primijeniti ispitivane kemikalije — Odmjeriti ispitni supstrat u ispitne posude — Umiješati hranu — Unijeti crve — Izmjeriti pH-vrijednost i sadržaj vlage u tlu	— Pripremiti radne otopine — Primijeniti ispitivane kemikalije — Odmjeriti ispitni supstrat u ispitne posude — Umiješati hranu — Unijeti crve — Izmjeriti pH-vrijednost i sadržaj vlage u tlu
Dan 7.	— Provjeriti sadržaj vlage u tlu	— Provjeriti sadržaj vlage u tlu — Hranjenje
Dan 14.	— Odrediti smrtnost odraslih jedinki — Procijeniti broj mladih jedinki — Izmjeriti pH-vrijednost i sadržaj vlage u tlu	— Provjeriti sadržaj vlage u tlu — Hranjenje
Dan 21.		— Promatrati ponašanje odraslih jedinki — Ukloniti odrasle jedinke — Odrediti smrtnost odraslih jedinki — Provjeriti sadržaj vlage u tlu — Hranjenje
Dan 28.		— Provjeriti sadržaj vlage u tlu — Ne dodavati hranu
Dan 35.		— Provjeriti sadržaj vlage u tlu — Hranjenje
Dan 42.		— Prebrojavanje mladih crva — Izmjeriti pH-vrijednost i sadržaj vlage u tlu

▼M6

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

39. Iako je u Dodatku 7. naveden opći pregled, u ovoj se ispitnoj metodi ne daje stroga statistička smjernica za analizu rezultata ispitivanja.

40. U ispitivanju za određivanje raspona smrtnost je glavna krajnja točka. Međutim potrebno je zabilježiti i promjene u ponašanju odraslih jedinki (npr. nesposobnost ukopavanja u tlo, nepomično pripijanje uz staklenu stijenku ispitne posude) i u njihovoj morfologiji (npr. otvorene rane), kao i prisutnost mladih jedinki. Za određivanje vrijednosti LC_{50} u pravilu je potrebno primijeniti probit-analizu (21) ili logističku regresiju. Međutim, u slučajevima u kojima je ta metoda analize neprikladna (npr. ako imamo manje od tri koncentracije koje uzrokuju djelomičnu smrtnost), mogu se primijeniti alternativne metode. To mogu biti metoda pomičnih prosjeka (22), modificirana Spearman-Karberova metoda (23) ili jednostavna interpolacija (npr. geometrijska sredina vrijednosti LC_0 i LC_{100}, izračunana množenjem drugog korijena vrijednosti LC_0 s vrijednošću LC_{100}).

41. U glavnom je ispitivanju krajnja točka plodnost (tj. broj nastalih mladih jedinki). Međutim i tu, kao i kod ispitivanja za određivanje raspona, u završnom izvješću potrebno je navesti sve ostale znakove koji ukazuju na štetno djelovanje. Da bi se izračunali rezultati koji se odnose na razmnožavanje, za statističku je analizu potrebno znati aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju po tretmanu i po kontroli.

42. Ako je provedena analiza varijance, standardna devijacija (s) i stupnjevi slobode (df) mogu se zamijeniti procjenom zajedničke (engl. *pooled*) varijance dobivenom ANOVA-om i njezinim stupnjevima slobode – pod uvjetom da varijanca ne ovisi o koncentraciji. U tom se slučaju upotrebljavaju pojedinačne varijance kontrole i tretmana. Te se vrijednosti obično izračunavaju s pomoću komercijalno dostupnog statističkog računalnog programa, pri čemu se rezultati dobiveni po posudi upotrebljavaju kao ponavljanja. Ako se čini da je razumnije združiti podatke za negativnu kontrolu i kontrolu s otapalom nego izračunati rezultate uspoređujući ih s jednom od tih dviju kontrola, te je podatke potrebno testirati kako bi se provjerilo da među njima nema značajnih razlika (za odgovarajuće testove vidjeti stavak 45. i Dodatak 7.).

43. Daljnje statističko testiranje i zaključivanje ovisi o tome jesu li vrijednosti dobivene u ponavljanjima normalno distribuirane i jesu li im varijance homogene.

Procjena NOEC-a

44. Poželjno je primijeniti snažne testove. Potrebno je koristiti se informacijama o tome jesu li podaci približno normalno distribuirani, npr. informacijama iz prijašnjeg iskustva s prstenastim ispitivanjem ili drugim podacima iz prethodno obavljenih ispitivanja. Od veće je važnosti homogenost varijance (homoskedastičnost). Iskustvo pokazuje da se varijanca često povećava kako se povećava srednja vrijednost. U tim bi se slučajevima homoskedastičnost mogla postići pretvorbom podataka. Međutim, ta se pretvorba mora temeljiti na podacima iz prethodno obavljenih ispitivanja, a ne na podacima koji se istražuju. S homogenim podacima potrebno je provesti t-testove višestruke usporedbe, kao što su Williamsov test ($\alpha = 0{,}05$, jednosmjerni) (24) (25) ili u nekim slučajevima Dunnettov test (26) (27). Potrebno je

▼M6

napomenuti da se u slučaju nejednake replikacije tablične t-vrijednosti moraju ispraviti, kako to sugeriraju Dunnett i Williams. Ponekad zbog velike varijacije ne dolazi do redovitog povećanja/smanjenja odgovora. U slučaju takvog velikog odstupanja od monotoničnosti primjereniji je Dunnettov test. Ako postoje odstupanja od homoskedastičnosti, možda bi bilo uputno temeljitije istražiti moguće učinke na varijance kako bi se moglo utvrditi mogu li se t-testovi primijeniti a da ne izgube mnogo na svojoj snazi (28). Alternativno se mogu primijeniti višestruki U-test, npr. Bonferronijev U-test prema Holmu (29) ili, kada podaci pokazuju heteroskedastičnost, ali su inače u skladu s temeljnim monotoničnim odnosom između doze i odgovora, neki drugi neparametarski test [npr. Jonckheere-Terpstra (30) (31) ili Shirley (32) (33)], kojima bi općenito trebalo davati prednost u odnosu na t-testove nejednake varijance. (Vidi i shemu u Dodatku 7.)

45. Ako je proveden granični test te su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost), može se primijeniti Studentov t-test parova, a u drugim slučajevima Mann-Whitneyjev U-test (29).

Procjena vrijednosti EC_x

46. Za izračunavanje bilo koje vrijednosti EC_x za regresijsku se analizu (linearnu ili nelinearnu) upotrebljavaju srednje vrijednosti po tretmanu, nakon što se dobije odgovarajuća funkcija doza-odgovor. Za rast crva kao kontinuirani odgovor vrijednosti EC_x mogu se procijeniti odgovarajućom regresijskom analizom (35). Među prikladne funkcije za kvantalne podatke (smrtnost/preživljavanje i broj mladih jedinki) spadaju normalna sigmoidna funkcija, logistička funkcija ili Weibullova funkcija, koje sadržavaju dva do četiri parametra, od kojih neki mogu modelirati hermetičke odgovore. Ako je funkcija doza-odgovor prilagođena linearnom regresijskom analizom, značajni r^2 (koeficijent određivanja) i/ili nagib potrebno je odrediti regresijskom analizom prije procjene vrijednosti EC_x uvrštavanjem vrijednosti koja odgovara x-postotnoj kontrolnoj srednjoj vrijednosti u jednadžbu dobivenu regresijskom analizom. Granice pouzdanosti od 95 % izračunavaju se prema Fielleru (citirano u Finney (21)) ili u skladu s drugim odgovarajućim suvremenim metodama.

47. Druga je mogućnost da se odgovor modelira kao postotak ili dio parametra modela koji se tumači kao kontrolni srednji odgovor. U tim se slučajevima normalna (logistička, Weibullova) sigmoidna krivulja često može lako prilagoditi rezultatima primjenom probit-regresije (21). U tim se slučajevima ponderacijska funkcija mora prilagoditi metričkim odgovorima prema Christensenu (36). Međutim, ako je uočena hormeza, probit-analizu potrebno je zamijeniti logističkom ili Weibullovom funkcijom s četiri parametra prilagođenom nelinearnom regresijom (36). Ako se prikladna funkcija doza-odgovor ne može prilagoditi podacima, mogu se primijeniti alternativne metode za procjenu vrijednosti EC_x i njezinih granica pouzdanosti, kao što su metoda pomičnih prosjeka prema Thompsonu (22) i modificirana Spearman-Karberova metoda (23).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

48. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalno stanje i, tamo gdje je relevantno, fizikalno-kemijska svojstva (npr. topljivost u vodi, tlak para),

— kemijska identifikacija ispitivane kemikalije prema nomenklaturi IUPAC-a, CAS broj, proizvodna serija, šarža, strukturna formula i čistoća,

— rok valjanosti uzorka.

Ispitne vrste:

— upotrijebljene ispitne životinje: vrsta, znanstveni naziv, izvor organizama i uvjeti uzgoja.

Uvjeti ispitivanja:

— sastojci i priprema umjetnog tla,

▼M6

— metoda primjene ispitivane kemikalije,

— opis uvjeta ispitivanja, uključujući temperaturu, sadržaj vlage, pH itd.,

— potpun opis plana i postupaka pokusa.

Rezultati ispitivanja:

— smrtnost odraslih crva nakon dva tjedna te broj mladih na kraju ispitivanja za određivanje raspona,

— smrtnost odraslih crva nakon tri tjedna izloženosti i potpuna evidencija mladih na kraju glavnog ispitivanja,

— svi uočeni fizički ili patološki simptomi i promjene ponašanja kod ispitnih organizama,

— vrijednosti LC_{50}, NOEC i/ili EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za razmnožavanje, ako su neke od njih primjenjive, te njihovi intervali pouzdanosti, kao i graf prilagođenog modela upotrijebljenog za njihov izračun te sve informacije i opažanja korisna za tumačenje rezultata.

Odstupanja od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave tijekom ispitivanja.

LITERATURA

(1) Römbke, J. (1989.) Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. i Moser, T. (1999.) Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, str. 150. + 223.

(3) Westheide, W. i Bethge-Beilfuss, D. (1991.) The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, U: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Uredili Esser, G. i Overdieck, D. str. 497. – 508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. i Notenboom, J. (1994.) Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. str. 46.

(5) Poglavlje C.8. ovog Priloga, Toksičnost za gujavice.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. i Augustsson, A. K. (1998.) Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). U: Løkke, H. i Van Gestel, C. A. M., Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73 – 94.

(9) Kasprzak, K. (1982.) Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217 – 232.

(10) Römbke, J. (1995.) Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246 – 249.

(11) Dunger, W. i Fiedler, H. J. (1997.) Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W. A. M. (1993.) Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2 – 29.

(13) Becker, H. (1991.) Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19 – 24.

(14) Römbke, J. i Federschmidt, A. (1995.) Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79 – 96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. i Achazi R. (2000.) Enchytraeen als Testorganismen. U: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. i Eisentraeger, A. (ur.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59 – 81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A. W. (1958.) The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1 – 13.

(18) Nielsen, C. O. i Christensen, B. (1959.) The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8 – 9, 1 – 160.

(19) Bouguenec, V. i Giani, N. (1987.) Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9 – 22.

(20) Korinkova, J. i Sigmund, J. (1968.) The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300 – 305.

(21) Finney, D. J. (1971.) Probit Analysis (3. izdanje), str. 19. – 76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D. J. (1978.) Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M. A., Russo, R. C. i Thurston, R. V. (1977.) Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714 – 719; Correction Environ. Sci. Technol. 12 (1998.), 417.

(24) Williams, D. A. (1971.) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D. A. (1972.) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C. W. (1955.) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C. W. (1964.) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998.) Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S. (1979.): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954.); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133 – 145.

(31) Terpstra, T. J. (1952.); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327 – 333.

(32) Shirley, E. A., (1979.); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144 – 151.

▼**M6**

(33) Williams, D. A. (1986.); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183 – 186.

(34) Sokal, R. R. i Rohlf, F. J. (1981.) Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2. izdanje. W. H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E. R. (1984.) Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213 – 221.

(36) Van Ewijk, P. H. i Hoekstra, J. A. (1993.) Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25 – 32.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode primjenjuju se sljedeće definicije:

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

EC_x (koncentracija s učinkom od x %): koncentracija koja u određenom razdoblju izloženosti izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. U ovom se ispitivanju koncentracije s učinkom iskazuju kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LC_0 (nesmrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju ne izaziva smrt nijednog izloženog ispitnog organizma. U ovom se ispitivanju LC_0 iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LC_{50} (srednja smrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju izaziva smrt 50 % izloženih ispitnih organizama. U ovom se ispitivanju LC_{50} iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LC_{100} (potpuno smrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju izaziva smrt 100 % izloženih ispitnih organizama. U ovom se ispitivanju LC_{100} iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom): najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja ima statistički značajan učinak ($p < 0,05$). U ovom se ispitivanju LOEC iskazuju kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla. Sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a u pravilu moraju imati učinak koji se statistički razlikuje od kontrole. Svako odstupanje od navedenoga pri određivanju LOEC-a mora biti obrazloženo u izvješću o ispitivanju.

NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka): najviša koncentracija ispitivane kemikalije neposredno ispod LOEC-a kod koje nije uočen nikakav učinak. U ovom ispitivanju koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u određenom razdoblju izloženosti u usporedbi s kontrolom.

Stopa razmnožavanja: srednji broj mladih crva dobivenih od određenog broja odraslih crva u razdoblju ispitivanja.

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

▼M6

Dodatak 2.

Određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta

Određivanje vodnog kapaciteta umjetnog tla

Prikladnom se pokazala sljedeća metoda. Opisana je u Prilogu C normi ISO DIS 11268-2.

Odgovarajućom napravom (npr. svrdlom s epruvetom) uzme se određena količina (npr. 5 g) tla koje služi kao ispitni supstrat. Dno epruvete prekrije se komadom filtarskog papira te se nakon punjenja vodom epruveta postavi na stalak u vodenoj kupelji. Epruvetu je potrebno postupno uranjati sve dok razina vode ne bude iznad gornjeg dijela tla. Potom je treba ostaviti u vodi tri sata. Budući da tlo ne može zadržati svu vodu koju apsorbira kapilarama, uzorak tla potrebno je ostaviti dva sata da se ocijedi tako što se epruveta postavi na podlogu od vrlo mokrog fino usitnjenog kremenog pijeska u zatvorenoj posudi (da se spriječi sušenje). Uzorak je potom potrebno izvagati i osušiti do stalne mase na 105 °C. Vodni kapacitet (WHC) potom se može izračunati kako slijedi:

$$\text{WHC (u postotku suhe mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

gdje je:

S = supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filtarskog papira,

T = tara (masa epruvete + masa filtarskog papira),

D = suha masa supstrata.

UPUĆIVANJA:

ISO (International Organization for Standardization) (1996.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Ženeva.

▼**M6**

Dodatak 3.

Određivanje ph-vrijednosti tla

Sljedeća se metoda određivanja pH-vrijednosti uzorka tla temelji na opisu navedenom u normi ISO 10390 (Kakvoća tla – određivanje pH-vrijednosti).

Definirana količina tla suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Potom se tlo (najmanje 5 grama) suspendira u pet puta većoj količini 1 M kalijeva klorida (KCl) analitičkog stupnja čistoće ili 0,01 M otopine kalcijeva klorida ($CaCl_2$) analitičkog stupnja čistoće. Suspenzija se nakon toga protresa pet minuta. Nakon protresanja suspenzija se ostavlja da se taloži najmanje dva sata, ali ne dulje od 24 sata. Potom se pH-vrijednost tekuće faze izmjeri pH-metrom koji se prije svakog mjerenja kalibrira s pomoću odgovarajućeg niza puferskih otopina (npr. pH 4,0 i 7,0).

UPUĆIVANJA:

ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Ženeva.

▼M6

Dodatak 4.

Uvjeti uzgoja *Enchytraeus* sp.

Enhitreji vrste *Enchytraeus albidus* (kao i ostale vrste *Enchytraeus*) mogu se uzgajati u velikim plastičnim kutijama (npr. 30 × 60 × 10 cm) napunjenima mješavinom umjetnog tla i prirodnog, neonečišćenog vrtnog tla u omjeru 1:1. Mora se izbjegavati kompost jer može sadržavati toksične kemikalije poput teških metala. Prije uporabe iz tla potrebno je ukloniti faunu (npr. dubokim zamrzavanjem). Može se upotrebljavati i supstrat koji se sastoji isključivo od umjetnog tla, ali je moguće da će stopa razmnožavanja biti manja od one koja se postiže kod supstrata s miješanim tlom. pH supstrata mora iznositi 6,0 ± 0,5.

Kultura se drži u mraku na temperaturi od 15 do 20 °C ± 2 °C. Moraju se izbjegavati temperature iznad 23 °C. Tlo se mora održavati tako da bude vlažno, ali ne mokro. Na ispravan sadržaj vlage u tlu ukazuju sitne kapljice vode koje se pojave među prstima kad se tlo blago stisne rukom. Mora se izbjegavati stvaranje anoksičnih uvjeta, i to tako da se osigura da poklopci posuda za uzgoj omogućuju dovoljnu razmjenu plinova s atmosferom. Tlo je potrebno pažljivo promiješati jedanput tjedno da se omogući dozračivanje.

Crve se može hraniti zobenim pahuljicama. Zob je potrebno čuvati u zatvorenim posudama te je obraditi u autoklavu ili zagrijati prije uporabe kako bi se izbjegle infekcije grinjama iz brašna (npr. *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) ili grabežljivim grinjama [npr. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Nakon toplinske obrade hranu je potrebno samljeti da bi se mogla lakše rasuti po površini tla. S vremena na vrijeme zobenim se pahuljicama mogu dodati vitamini, mlijeko i ulje jetre bakalara. Ostali su prikladni izvori hrane pekarski kvasac i riblja hrana „Tetramin”.

Hrana se daje otprilike dva puta tjedno. Odgovarajuća količina zobenih pahuljica pospe se po površini tla ili se pažljivo umiješa u supstrat prilikom miješanja tla radi dozračivanja. Apsolutna količina hrane koja se daje ovisi o broju crva prisutnih u supstratu. Za orijentaciju, količinu hrane potrebno je povećati ako se u cijelosti pojede u roku od jednog dana od davanja. I obratno, ako u trenutku sljedećeg hranjenja (tjedan kasnije) na površini tla još uvijek ima ostataka hrane, količinu je potrebno smanjiti. Hranu kontaminiranu gljivicama potrebno je ukloniti i zamijeniti. Nakon tri mjeseca crve je potrebno prenijeti u svježe pripremljen supstrat.

Smatra se da su uvjeti uzgoja zadovoljavajući ako crvi: (a) ne pokušavaju izići iz supstrata; (b) brzo se kreću kroz tlo; (c) imaju sjajnu vanjsku površinu na koju se ne lijepe čestice tla; (d) više-manje su bijele boje; (e) pokazuju različite raspone starosti u kulturama i (f) stalno se razmnožavaju.

▼M6

Dodatak 5.

Provođenje ispitivanja s drugim vrstama *Enchytraeus*

Odabir vrste

Mogu se upotrebljavati i druge vrste osim *E. albidus*, ali u tom je slučaju potrebno na odgovarajući način prilagoditi ispitni postupak i kriterije valjanosti. Budući da su mnoge vrste *Enchytraeus* lako dostupne i može ih se na zadovoljavajući način održavati u laboratoriju, najvažniji je kriterij za odabir druge vrste umjesto *E. albidus* ekološka relevantnost i, dodatno, usporediva osjetljivost. Ponekad je promjena vrste potrebna zbog formalnih razloga. Na primjer, u državama u kojima nema *E. albidus* i ne može ih se uvoziti (npr. zbog ograničenja uvedenih zbog karantene) bit će nužno upotrijebiti drugu vrstu *Enchytraeus*.

Primjeri prikladnih alternativnih vrsta

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide i Graefe, 1992.): Zadnjih se godina ova vrsta često upotrebljava u ekotoksikološkim istraživanjima jer ju je lako uzgajati i ispitivati. Međutim, malena je pa je njome teže rukovati nego vrstom *E. albidus* (posebno u fazama prije primjene metode bojenja). Nije sa sigurnošću dokazano da *E. crypticus* nastanjuje polja, samo je opisana u kulturama gujavica. Stoga nisu poznati njezini ekološki zahtjevi.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879.): Ovaj naziv vjerojatno obuhvaća skupinu blisko povezanih vrsta koje je teško morfološki razlikovati. Ne preporučuje se upotrebljavati je za ispitivanja ako jedinke namijenjene ispitivanju nije moguće identificirati na razini vrste. *E. buchholzi* obično nastanjuje livade i poremećena mjesta poput pojasa uz ceste.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Ova vrsta, prvobitno poznata kao *E. minutus*, tek je nedavno opisana (1). Prvi ju je pronašao U. Graefe (Hamburg) na livadi u blizini St. Peter-Ordinga (Schleswig-Holstein, Njemačka). *E. luxuriosus* doseže otprilike polovicu veličine *E. albidus*, ali je veća od drugih vrsta o kojima se ovdje govori; stoga bi mogla biti dobra zamjena za *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen i Christensen, 1963.): Do danas postoje izvješća o prisutnosti ove vrste u njemačkim i španjolskim mineralnim tlima, u kojima je uobičajena, ali općenito ne i vrlo brojna. U usporedbi s drugim malim vrstama ovog roda, relativno ju je lako identificirati. Ne zna se ništa o njezinu ponašanju u laboratorijskim ispitivanjima ili njezinoj osjetljivosti na kemikalije. Međutim, pokazalo se da ju je lako uzgajati (E. Belotti, osobna komunikacija).

Uvjeti uzgoja

Sve navedene vrste *Enchytraeus* mogu se uzgajati u istim supstratima kao i *E. albidus*. S obzirom na to da su manje, mogu se uzgajati u manjim posudama te, iako se može upotrebljavati ista hrana, količinu hrane treba prilagoditi. Životni ciklus tih vrsta kraći je nego kod *E. albidus* pa se hranjenje mora provoditi češće.

Uvjeti ispitivanja

Uvjeti ispitivanja općenito su isti kao oni koji se primjenjuju na *E. albidus*, osim što:

— posuda za uzgoj može (ali ne mora) biti manja,

— test reproduktivne toksičnosti može (ali ne mora) trajati kraće, tj. četiri umjesto šest tjedana; međutim, trajanje ispitivanja za određivanje raspona ne bi se smjelo promijeniti,

— s obzirom na to da su mladi crvi vrlo maleni, za njihovo se brojenje čvrsto preporučuje primjena metode bojenja,

— kriterij valjanosti koji se odnosi na „broj mladih jedinki po ispitnoj posudi u kontroli” potrebno je promijeniti na „50”.

▼**M6**

UPUĆIVANJA

(1) Schmelz, R. M. i Collado, R. (1999.) Enchytraeus luxuriosus sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93 – 100.

▼M6

Dodatak 6.

Detaljan opis ekstrakcijskih tehnika

Bojenje bengalskim crvenilom

Ova je metoda izvorno razvijena u limničkoj ekologiji (1), a njezinu primjenu za brojenje mladih enhitreja u ispitivanju reproduktivne toksičnosti na enhitrejama prvi je predložio W. de Coen (Sveučilište u Ghentu, Belgija). RIVM Bilthoven (2) (3) neovisno je razvio modificiranu verziju (bengalsko crvenilo pomiješano s formaldehidom umjesto s etanolom).

Na kraju glavnog ispitivanja (tj. nakon šest tjedana), tlo is ispitnih posuda prenosi se u plitku posudu. U tu svrhu mogu biti korisne posuda Bellaplast ili kada za razvijanje fotografija s rebrastim dnom, i to, kad je riječ o kadi, zbog toga što „rebra" ograničavaju kretanje crva unutar područja promatranja. Mlade se jedinke fiksiraju etanolom (oko 5 ml po ponavljanju). Posude se potom napune vodom do visine od 1 do 2 cm. Dodaje se nekoliko kapi (200 do 300 µl) bengalskog crvenila (1-postotna otopina u etanolu) (ili 0,5 % eozina) te se ta dva sastojka pažljivo promiješaju. Nakon 12 sati crvi bi trebali poprimiti crvenkastu boju i trebalo bi ih biti lako izbrojiti jer će ležati na površini supstrata. Druga je mogućnost da se smjesa supstrata i alkohola ispere kroz sito (veličine otvora 0,250 mm) prije brojenja crva. Tim se postupkom ispere kaolinit, treset i nešto pijeska pa je lakše uočiti i izbrojiti crvenkasto obojene crve. Brojenje će olakšati i uporaba osvijetljenog povećala (veličina leće najmanje 100 × 75 mm s faktorom povećanja od dva do tri puta).

Tehnika bojenja smanjuje vrijeme brojenja na nekoliko minuta po posudi pa bi, za orijentaciju, jedna osoba mogla procijeniti sve posude iz jednog ispitivanja za najviše dva dana.

Ekstrakcija mokrim postupkom

Ekstrakciju mokrim postupkom potrebno je započeti odmah nakon završetka ispitivanja. Tlo iz svake ispitne posude stavlja se u plastična sita veličine otvora oko 1 mm. Sita se potom objese u plastične zdjele tako da ne dodiruju dno. Zdjele se pažljivo pune vodom sve dok uzorci u sitima ne budu potpuno ispod površine vode. Kako bi se osigurala stopa iskorištenja veća od 90 % prisutnih crva, razdoblje ekstrakcije mora trajati tri dana na temperaturi od 20 ± 2 °C. Na kraju razdoblja ekstrakcije sita se uklanjaju te se voda (osim male količine) polako dekantira, pazeći da se ne poremeti sediment na dnu zdjela. Plastične se zdjele potom lagano protresu kako bi se sediment suspendirao u vodi iznad sebe. Voda se prenosi u Petrijevu zdjelicu te se, nakon što se čestice tla slože, enhitreji mogu identificirati, ukloniti i izbrojiti s pomoću stereomikroskopa i mekane čelične pincete.

Flotacija

Metodu koja se temelji na flotaciji opisao je u napomeni R. Kuperman (4). Nakon što se sadržaj ispitne posude fiksira etanolom, tlo se prelije Ludoxom (koloidna silika AM-30, 30 wt. % vodene suspenzije) do visine od 10 do 15 mm iznad površine tla. Nakon što se tlo temeljito miješa sa sredstvom za flotaciju dvije do tri minute, mladi crvi koji plutaju po površini mogu se lako izbrojiti.

UPUĆIVANJA

(1) Korinkova, J. i Sigmund, J. (1968.) The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300 – 305.

▼M6

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. i Notenboom, J. (1994.) Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport No. 719102025. str. 46.

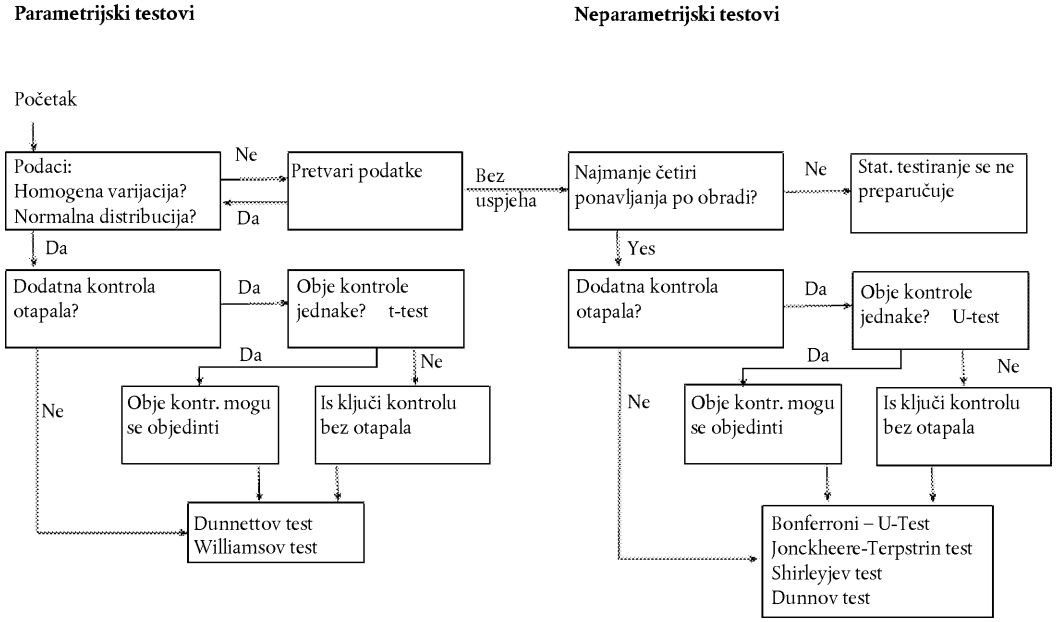
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R. P. M. i Dirven-Van Breemen, E. M. (1997.) Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108 – 121.

(4) Phillips, C. T., Checkai, R. T. i Kuperman, R. G. (1998.) An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, SAD. Abstract Book No. PMP069, str. 157.

▼**M6**

Dodatak 7.

Pregled statističke procjene podataka (određivanje NOEC-a)



▼M6

C.33. TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA GUJAVICAMA (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 222 (2004.). Namijenjena je procjeni učinaka kemikalija u tlu na reprodukcijsku uspješnost (i druge subletalne krajnje točke) gujavica vrste *Eisenia fetida* (Savigny, 1826.) ili *Eisenia andrei* (Andre, 1963.) (1)(2). Metoda je ispitana u prstenastom testu (3). Postoji ispitna metoda za ispitivanje akutne toksičnosti za gujavice (4). Objavljen je niz drugih međunarodnih i nacionalnih smjernica za ispitivanje akutne i kronične toksičnosti za gujavice (5) (6) (7) (8).

2. *Eisenia fetida /Eisenia andrei* smatraju se predstavnicima faune tla, posebno gujavica. Osnovne informacije o ekologiji gujavica i njihovoj uporabi u ekotoksikologiji mogu se pronaći u literaturi (7) (9) (10) (11) (12).

NAČELO ISPITIVANJA

3. Odrasle se gujavice izlažu nizu koncentracija ispitivane kemikalije umiješane u tlo ili, u slučaju pesticida, primijenjene u ili na tlo postupcima koji su u skladu s obrascem uporabe predmetne kemikalije. Metoda primjene ovisi o svrsi testa. Raspon ispitnih koncentracija bira se tako da obuhvaća one za koje postoji vjerojatnost da će u razdoblju od osam tjedana izazvati subletalne i letalne učinke. Smrtnost i učinci na rast odraslih gujavica utvrđuju se nakon četiri tjedna izloženosti. Odrasle se gujavice potom uklanjaju iz tla te se nakon dodatna četiri tjedna procjenjuju učinci na razmnožavanje brojenjem njihovih potomaka prisutnih u tlu. Reprodukcijska uspješnost gujavica izloženih ispitivanoj kemikaliji uspoređuje se s kontrolom odnosno kontrolama kako bi se odredila (i) najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) i/ili (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) primjenom regresijskog modela kako bi se procijenila koncentracija koja bi izazvala x-postotno smanjenje reprodukcijske uspješnosti. Ispitne koncentracije moraju obuhvaćati EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako da se EC_x potom može dobiti interpolacijom, a ne ekstrapolacijom (za definicije vidjeti dodatak 1.).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

4. Potrebno je raspolagati sljedećim informacijama o ispitivanoj kemikaliji koje će pomoći u planiranju odgovarajućih ispitnih postupaka:

— topljivost u vodi,

— log K_{ow},

— tlak para i

— po mogućnosti informacije o sudbini i ponašanju u okolišu (npr. brzina fotolize i brzina hidrolize ako su ti parametri relevantni s obzirom na načine primjene).

5. Ova se ispitna metoda može primijeniti na sve kemikalije, neovisno o njihovoj topljivosti u vodi. Ova ispitna metoda nije primjenjiva na hlapljive kemikalije, koje se ovdje definiraju kao kemikalije za koje su Henryjeva konstanta ili koeficijent razdjeljenja između zraka i vode veći od jedan, ili na kemikalije čiji je tlak para veći od 0,0133 Pa pri 25 °C.

6. U ovoj se ispitnoj metodi ne uzima u obzir moguća razgradnja ispitivane kemikalije u razdoblju ispitivanja. Stoga se ne može pretpostaviti da će koncentracije izlaganja zadržati svoje početne vrijednosti tijekom cijelog ispitivanja. U tom se slučaju preporučuje provesti kemijsku analizu ispitivane kemikalije na početku i na kraju ispitivanja.

▼M6

REFERENTNA KEMIKALIJA

7. Moraju se odrediti NOEC i/ili EC_x referentne kemikalije kako bi se zajamčilo da su uvjeti laboratorijskog ispitivanja odgovarajući te kako bi se potvrdilo da se odgovor ispitnih organizama statistički ne mijenja tijekom vremena. Preporučljivo je ispitati referentnu kemikaliju barem jednom godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s određivanjem toksičnosti ispitivane kemikalije. Prikladne su referentne kemikalije karbendazim ili benomil, za koje se pokazalo da utječu na razmnožavanje (3). Značajne učinke trebalo bi uočiti između (a) 1 i 5 mg aktivnog sastojka (a. s.) / kg suhe mase ili (b) 250 – 500 g/ha ili 25 – 50 mg/m^2. Ako se u ispitni niz uključi pozitivan toksični standard, upotrebljava se jedna koncentracija i jednak broj ponavljanja kao i kod kontrola.

VALJANOST ISPITIVANJA

8. Da bi se rezultat ispitivanja smatrao valjanim, kontrole moraju zadovoljavati sljedeće kriterije:

— u svakom ponavljanju (koje sadržava deset odraslih jedinki) mora biti dobiveno ≥ 30 mladih do kraja ispitivanja,

— koeficijent varijacije razmnožavanja mora biti ≤ 30 %,

— smrtnost odraslih životinja tijekom prva četiri tjedna ispitivanja mora biti ≤ 10 %.

Ako ispitivanje ne ispuni navedene kriterije valjanosti, potrebno ga je prekinuti, osim ako postoji opravdanje za njegov nastavak. To se opravdanje mora navesti u izvješću.

OPIS ISPITIVANJA

Oprema

9. Moraju se upotrebljavati ispitne posude od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala zapremnine oko jedne do dvije litre. Površina poprečnog presjeka posude mora iznositi oko 200 cm^2, tako da se dodavanjem 500 do 600 g suhe mase supstrata postigne dubina mokrog supstrata od oko 5 do 6 cm. Posuda mora biti izrađena na način da omogućuje razmjenu plinova između supstrata i atmosfere te pristup svjetla (npr. s pomoću perforiranog prozirnog poklopca) te istodobno sprječava bijeg gujavica. Ako je količina upotrijebljenog ispitnog supstrata značajno veća od 500 do 600 g po ispitnoj posudi, broj gujavica potrebno je razmjerno povećati.

10. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema, a posebno:

— ormar za sušenje,

— stereomikroskop,

— pH-metar i fotometar,

— prikladne precizne vage,

— odgovarajuća oprema za kontrolu temperature,

— odgovarajuća oprema za kontrolu vlage (nije nužna ako ispitne posude imaju poklopce),

— inkubator ili manja prostorija opremljena klimatizacijskim uređajem,

— pincete, kuke ili petlje,

— vodena kupelj.

▼M6

Pripremanje umjetnog tla

11. U ovom se ispitivanju upotrebljava umjetno tlo (5) (7) sljedećeg sastava (na bazi suhe mase, osušene do stalne mase pri 105 °C):

— 10 % Sphagnum treseta (što bliže pH području od 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen, osušen do izmjerenog stupnja vlage),

— 20 % kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %),

— 0,3 do 1,0 % kalcijeva karbonata ($CaCO_3$ u prahu, analitičkog stupnja čistoće) da se dobije početna pH-vrijednost od 6,0 ± 0,5.

— 70 % kremenog pijeska sušenog na zraku (ovisno o potrebnoj količini $CaCO_3$), pretežno finog pijeska s više od 50 % čestica veličine između 50 i 200 mikrona.

Napomena 1.: Količina potrebnog $CaCO_3$ ovisit će o sastojcima tla, uključujući hranu, i potrebno ju je odrediti mjerenjem poduzoraka tla neposredno prije ispitivanja. pH se mjeri na uzorku tla pomiješanog s 1 M otopinom kalijeva klorida (KCl) ili 0,01 M otopinom kalcijeva klorida ($CaCl_2$) (13).

Napomena 2.: Sadržaj organskog ugljika u umjetnom tlu može se smanjiti, npr. smanjenjem sadržaja treseta na 4 do 5 % i sukladnim povećanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjenjem sadržaja organskog ugljika može se smanjiti mogućnost adsorpcije ispitivane kemikalije u tlo (organski ugljik) te povećati dostupnost ispitivane kemikalije gujavicama. Pokazalo se da *Eisenia fetida* može ispuniti kriterije valjanosti koji se odnose na razmnožavanje kada se ispituje u tlima nižeg sadržaja organskog ugljika (2,7 %) (14), a iskustvo pokazuje da se to može postići i s umjetnim tlom s 5 % treseta. Stoga prije uporabe takvog tla u glavnom ispitivanju nije potrebno dokazati da je umjetno tlo prikladno za ispunjivanje kriterija valjanosti ispitivanja, osim ako se sadržaj treseta smanji više nego što je navedeno ranije u tekstu.

Napomena 3.: Ako se u dodatnim ispitivanjima (npr. ispitivanjima višeg stupnja) upotrebljava prirodno tlo, isto je tako potrebno dokazati prikladnost tla i ispunjenje kriterija valjanosti ispitivanja.

12. Suhi sastojci tla temeljito se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijskoj miješalici) na dobro prozračenom mjestu. Prije početka ispitivanja suho umjetno tlo vlaži se dodavanjem dovoljne količine deionizirane vode da se dobije otprilike polovica konačnog sadržaja vode, tj. 40 % do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta (što odgovara sadržaju od 50 ± 10 % vlage po suhoj masi). Time se dobiva supstrat na kojemu ne leži voda ili iz kojeg ne istječe voda kad se zgnječi rukom. Maksimalni vodni kapacitet (WHC) umjetnog tla određuje se u skladu s postupcima opisanima u Dodatku 2., normi ISO 11274 (15) ili istovrijednoj normi EU-a.

13. Ako se ispitivana kemikalija primjenjuje na površinu tla ili je umiješana u tlo bez vode, konačna količina vode može se umiješati u umjetno tlo tijekom pripreme tla. Ako se ispitivana kemikalija umiješa u tlo zajedno s određenom količinom vode, dodatna se voda može unijeti zajedno s ispitivanom kemikalijom.

14. Sadržaj vlage u tlu određuje se na početku i na kraju ispitivanja u skladu s normom ISO 11465 (16) ili istovrijednom normom EU-a, a pH-vrijednost tla u skladu s Dodatkom 3. ili normom ISO 10390 (13) ili istovrijednom normom EU-a. Ta se određivanja provode na uzorku kontrolnog tla i na

▼M6

uzorku tla svake ispitne koncentracije. pH-vrijednost tla nije potrebno prilagođavati ako se ispituju kisele ili lužnate kemikalije. Sadržaj vlage potrebno je pratiti tijekom cijelog ispitivanja periodičnim vaganjem posuda (vidjeti stavke 26. i 30.).

Odabir i priprema ispitnih životinja

15. U ispitivanju se upotrebljava vrsta *Eisenia fetida* ili *Eisenia andrei* (1) (2). Da bi se započelo s ispitivanjem, potrebne su odrasle gujavice stare između dva mjeseca i godinu dana s razvijenim klitelumom. Gujavice je potrebno izabrati iz sinkronizirane kulture relativno homogene dobne strukture (Dodatak 4.). Starost jedinki u istoj ispitnoj skupini ne bi se smjela razlikovati za više od četiri tjedna.

16. Izabrane gujavice potrebno je aklimatizirati najmanje jedan dan u onoj vrsti umjetnog tla koja će se upotrebljavati u ispitivanju. U tom je razdoblju gujavice potrebno hraniti istom hranom kakva će se upotrebljavati u ispitivanju (vidjeti stavke od 31. do 33.).

17. Na početku ispitivanja skupine od deset gujavica potrebno je pojedinačno izvagati i nasumično rasporediti u ispitne posude. Gujavice se prije vaganja operu (deioniziranom vodom) te se višak vode ukloni kratkim držanjem gujavica na filtarskom papiru. Mokra masa pojedinačnih gujavica mora iznositi između 250 i 600 mg.

Priprema ispitnih koncentracija

18. Mogu se upotrijebiti dvije metode primjene ispitivane kemikalije: ispitivana se kemikalija može umiješati u tlo (vidjeti stavke 19. do 21.) ili primijeniti po površini tla (vidjeti stavke 22. do 24.). Odabir odgovarajuće metode ovisi o svrsi ispitivanja. Općenito se preporučuje umiješati ispitivanu kemikaliju u tlo. Međutim, možda će biti potrebno primijeniti postupke koji odgovaraju uobičajenoj poljoprivrednoj praksi (npr. raspršivanje tekuće formulacije ili uporaba posebnih formulacija pesticida poput granula ili sredstava za tretiranje sjemena). Otapala za lakše tretiranje tla ispitivanom kemikalijom potrebno je odabrati na temelju njihove niske toksičnosti za gujavice te je u plan ispitivanja potrebno uključiti odgovarajuću kontrolu tretiranu otapalom (vidjeti stavak 27.).

Miješanje ispitivane kemikalije u tlo

Ispitivana kemikalija topljiva u vodi

19. Otopina ispitivane kemikalije priprema se u deioniziranoj vodi neposredno prije početka ispitivanja, u količini dovoljnoj za sva ponavljanja jedne koncentracije. Radi lakše pripreme ispitne otopine, ponekad je potrebno upotrijebiti suotapalo. Prikladno je pripremiti onu količinu otopine koja je potrebna da se postigne konačan sadržaj vlage (40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta). Otopina se temeljito izmiješa sa supstratom tla prije nego što se uvede u ispitnu posudu.

Ispitivana kemikalija netopljiva u vodi

20. Ispitivana se kemikalija otopi u maloj količini odgovarajućeg organskog otapala (npr. acetona) te se raspršи po maloj količini finog kremenog pijeska ili se umiješa u njega. Otapalo se potom uklanja isparavanjem u digestoru najmanje nekoliko minuta. Tretirani se pijesak potom temeljito pomiješa s prethodno navlaženim umjetnim tlom. Potom se doda deionizirana voda (potrebna količina) kako bi se postigao konačan sadržaj vlage od 40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta i pomiješa se s tlom. Tlo je tada spremno za stavljanje u ispitne posude. Potrebno je voditi računa o tome da neka otapala mogu biti toksična za gujavice.

▼M6

Ispitivana kemikalija netopljiva u vodi i organskim otapalima

21. Pripremi se smjesa od 10 g fino usitnjenog industrijskog kremenog pijeska i onolike količine ispitivane kemikalije kolika je potrebna za postizanje ispitne koncentracije u tlu. Smjesa se temeljito pomiješa s prethodno navlaženim umjetnim tlom. Potom se doda deionizirana voda u količini potrebnoj da se postigne konačan sadržaj vlage od 40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta i pomiješa se s tlom. Tlo je tada spremno za stavljanje u ispitne posude.

Primjena ispitivane kemikalije na površinu tla

22. Tlo se tretira nakon što se dodaju gujavice. Ispitne se posude prvo napune navlaženim supstratom tla i potom se na površinu stave izvagane gujavice. Zdrave se gujavice obično odmah ukopavaju u supstrat pa se prema tome sve gujavice koje se nakon 15 minuta još uvijek nalaze na površini smatraju oštećenima i moraju se zamijeniti. Ako se gujavice zamjenjuju, potrebno je izvagati nove i one koje su zamijenjene, tako da je na početku poznata ukupna živa masa izložene skupine gujavica i ukupna masa posude s gujavicama.

23. Primjenjuje se ispitivana kemikalija. Ne smije se dodati u tlo unutar pola sata od unošenja gujavica (ili ako su gujavice prisutne na površini tla) kako bi se izbjegla izravna izloženost ispitivanoj kemikaliji putem dodira s kožom. Ako je ispitivana kemikalija pesticid, može je biti prikladno primijeniti na površinu tla raspršivanjem. Ispitivanu kemikaliju potrebno je primijeniti na površinu tla što je moguće ravnomjernije s pomoću laboratorijske prskalice prikladne za simuliranje raspršivanja na polju. Prije primjene potrebno je ukloniti poklopac posude i zamijeniti ga oplatom koja će štititi stranice posude od prskanja. Oplata može biti napravljena od ispitne posude kojoj je uklonjeno dno. Primjena se provodi pri temperaturi od 20 ± 2 °C te, ako je riječ o vodenim otopinama, emulzijama ili disperzijama, u dozi od 600 do 800 µl/m^2. Dozu je potrebno provjeriti odgovarajućom kalibracijskom tehnikom. Posebne formulacije poput granula i sredstava za tretiranje sjemena potrebno je primijeniti onako kako se primjenjuju u poljoprivredi.

24. Ispitne posude potrebno je ostaviti otvorenima sat vremena kako bi moglo ispariti hlapljivo otapalo povezano s primjenom ispitivane kemikalije. Potrebno je paziti da za to vrijeme iz ispitnih posuda ne pobjegne nijedna gujavica.

POSTUPAK

Ispitne skupine i kontrole

25. Preporučuje se punjenje od deset gujavica u od 500 do 600 g suhe mase umjetnog tla (tj. od 50 do 60 g tla po gujavici). Ako se upotrebljavaju veće količine tla, kao što može biti slučaj ako se ispituju pesticidi koji zahtijevaju poseban načinom primjene, kao što su sredstva za tretiranje sjemena, punjenje od 50 do 60 g tla po gujavici može se održati povećanjem broja gujavica. Za svaku se kontrolnu i tretiranu posudu priprema deset gujavica. Gujavice se isperu vodom i osuše te nakratko postave na upijajući papir kako bi se ocijedio višak vode.

26. Kako bi se izbjegle sustavne pogreške pri raspodjeli gujavica u ispitne posude, potrebno je utvrditi homogenost ispitne populacije pojedinačnim vaganjem 20 gujavica nasumično odabranih iz populacije iz koje će se uzeti ispitne gujavice. Nakon što se utvrdi homogenost, biraju se serije

▼M6

gujavica te se važu i nasumično raspoređuju u ispitne posude. Nakon dodavanja ispitnih gujavica, potrebno je izvagati svaku ispitnu posudu kako bi se dobila početna masa koja će služiti kao temelj za praćenje sadržaja vlage u tlu tijekom ispitivanja, kako je opisano u stavku 30. Ispitne se posude potom prekrivaju na način opisan u stavku 9. i stavljaju u ispitnu komoru.

27. Za svaku metodu primjene ispitivane kemikalije opisanu u stavcima 18. do 24. pripremaju se odgovarajuće kontrole. Kontrole se pripremaju u skladu s odgovarajućim postupcima, osim što se ne dodaje ispitivana kemikalija. Prema tomu, kontrolama se prema potrebi dodaje organsko otapalo, kremeni pijesak ili drugi nosači u koncentracijama/količinama koje su u skladu s onima koje su upotrijebljene u tretmanima. Ako se ispitivana kemikalija dodaje s pomoću otapala ili nekog drugog nosača, potrebno je pripremiti dodatnu kontrolu bez nosača ili ispitivane kemikalije te je ispitati kako bi se osiguralo da nosač ne utječe na rezultat.

Uvjeti ispitivanja

28. Ispitna temperatura iznosi 20 ± 2 °C. Ispitivanje se provodi uz kontrolirane cikluse izmjene svjetlosti i tame (po mogućnosti 16 sati svjetla i osam sati tame) uz osvjetljenje od 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda.

29. Ispitne se posude ne dozračuju tijekom ispitivanja, ali poklopci ispitnih posuda moraju biti takvi da omogućuju izmjenu plinova i istodobno ograničavaju isparavanje vlage (vidjeti stavak 9.).

30. Sadržaj vode u supstratu u ispitnim posudama održava se tijekom cijelog ispitivanja periodičnim vaganjem ispitnih posuda (bez poklopca). Gubitci se prema potrebi nadoknađuju deioniziranom vodom. Sadržaj vode ne smije odstupati za više od 10 % u odnosu na vrijednost na početku ispitivanja.

Hranjenje

31. Prihvatljivom se smatra svaka hrana čija je kvaliteta takva da omogućuje barem održavanje mase gujavica tijekom ispitivanja. Iskustvo je pokazalo da su za tu svrhu prikladni zobeno brašno te kravlji ili konjski gnoj. Potrebno je izvršiti provjere kako bi se osiguralo da se krave ili konji čiji je gnoj prikupljen ne liječe ili tretiraju kemikalijama poput pospješivača rasta, nematicida ili sličnih veterinarskih proizvoda koji bi mogli štetno utjecati na gujavice tijekom ispitivanja. Preporučuje se izravno prikupiti kravlji gnoj jer je iskustvo pokazalo da kravlji gnoj dostupan na tržištu kao vrtno gnojivo može imati štetne učinke na gujavice. Gnoj je potrebno osušiti na zraku, fino usitniti i pasterizirati prije uporabe.

32. Prije nego što se upotrijebi u ispitivanju, svaku svježu seriju hrane potrebno je dati kulturi gujavica koja nije obuhvaćena ispitivanjem kako bi se osiguralo da je prikladne kvalitete. Rast i proizvodnja kokona ne smiju biti smanjeni u usporedbi s gujavicama koje se drže u supstratu koji ne sadržava novu seriju hrane (uvjeti su opisani u ispitnoj metodi C.8. (4)).

33. Hrana se prvi put daje dan nakon unošenja gujavica i primjene ispitne kemikalije na tlo. Otprilike 5 g hrane nanese se po površini tla u svakoj posudi te se navlaži deioniziranom vodom (oko 5 ml do 6 ml po posudi). Potom se hrana daje jednom tjedno u razdoblju od četiri tjedna. Ako hrana

▼M6

ostane nepojedena, porcije hrane potrebno je smanjiti kako bi se spriječio rast gljivica ili plijesni. Odrasle se jedinke uklanjaju iz tla 28. dana ispitivanja. Potom se u svaku ispitnu posudu stavlja dodatnih 5 g hrane. Tijekom preostala četiri tjedna ispitivanja hrana se više ne daje.

Odabir ispitnih koncentracija

34. Prethodno znanje o toksičnosti ispitivane tvari, npr. iz ispitivanja akutne toksičnosti i/ili istraživanja za određivanje raspona, trebalo bi pomoći u odabiru odgovarajućih ispitnih koncentracija. Ako je potrebno, provodi se ispitivanje za određivanje raspona s na primjer pet ispitnih koncentracija: 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suhe mase tla). Dovoljno je jedno ponavljanje za svaki tretman i kontrolu. Ispitivanje za određivanje raspona traje dva tjedna te se na kraju ispitivanja procjenjuje smrtnost.

Plan pokusa

35. Budući da se za ovo ispitivanje ne može propisati jedinstvena zbirna statistika, ovom se ispitnom metodom predviđa određivanje NOEC-a i EC_x. Regulatorna će tijela u doglednoj budućnosti najvjerojatnije zahtijevati NOEC. U skoroj bi budućnosti moglo doći do još šire primjene vrijednosti EC_x zbog statističkih i ekoloških razloga. Stoga se predlažu tri plana na temelju preporuka proizišlih iz prstenastog ispitivanja testa reproduktivne toksičnosti za enhitreje (17).

36. Kod određivanja raspona koncentracija potrebno je voditi računa o sljedećemu:

— Za određivanje NOEC-a potrebno je ispitati najmanje pet/dvanaest koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 2,0.

— Za određivanje EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) preporučuje se odgovarajući broj koncentracija koje će izazvati najmanje četiri statistički značajno različita srednja odgovora pri tim koncentracijama. Preporučuju se najmanje dva ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i šest kontrolnih ponavljanja. Interval između koncentracija može se razlikovati, tj. može iznositi 1,8 ili manje u rasponu za koji se očekuje da će izazvati učinak te više od 1,8 kod viših i nižih koncentracija.

— Kombinirani pristup omogućuje određivanje i NOEC-a i vrijednosti ECx. Potrebno je upotrijebiti osam ispitnih koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 1,8.

Trajanje ispitivanja i mjerenja

37. Žive odrasle gujavice promatraju se i broje 28. dana. Bilježi se i svako neobično ponašanje (npr. nesposobnost ukopavanja u tlo, nepomično ležanje) te promjene u morfologiji (npr. otvorene rane). Sve se odrasle gujavice potom uklanjaju iz ispitnih posuda te se broje i važu. Odrasle jedinke lakše će se pronaći ako se prije procjene tlo u kojemu se nalaze gujavice prenese na čistu pliticu. Gujavice ekstrahirane iz tla potrebno je prije vaganja oprati (deioniziranom vodom) te višak vode ukloniti kratkim držanjem gujavica na filtarskom papiru. Sve gujavice koje nisu pronađene u ovoj fazi treba evidentirati kao uginule jer se mora pretpostaviti da su te gujavice uginule i da su se raspale prije ocjenjivanja.

▼M6

38. Ako je tlo uklonjeno iz posuda, vraća se u njih (bez odraslih gujavica, ali sa svim nastalim kokonima). Tlo se potom inkubira dodatna četiri tjedna u istim uvjetima ispitivanja, osim što se hranjenje provodi samo na početku ove faze ispitivanja (vidjeti stavak 33.).

39. Na kraju drugog četverotjednog razdoblja primjenom postupaka opisanih u Dodatku 5. utvrđuje se broj mladih koji su se izlegli iz kokona u ispitnom tlu, kao i broj kokona. Tijekom cijelog razdoblja ispitivanja potrebno je bilježiti sve znakove oštećenja ili ozljeda gujavica.

Granično ispitivanje

40. Ako se u ispitivanju za određivanje raspona ne uoče učinci pri najvećoj koncentraciji (tj. 1 000 mg/kg), provodi se test reproduktivne toksičnosti kao granični test s ispitnom koncentracijom od 1 000 mg/kg. Granično ispitivanje pruža mogućnost da se dokaže da je NOEC za razmnožavanje veći od granične koncentracije, uz minimalan broj gujavica upotrijebljenih u ispitivanju. Potrebno je upotrijebiti osam ponavljanja i za tretirano tlo i za kontrolu.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

41. Iako je u Dodatku 6. naveden opći pregled, u ovoj se ispitnoj metodi ne daje stroga statistička smjernica za analizu rezultata ispitivanja.

42. Jedna je od krajnjih točaka smrtnost. Međutim, potrebno je zabilježiti i promjene u ponašanju odraslih jedinki (npr. nesposobnost ukopavanja u tlo, nepomično pripijanje uz staklenu stijenku ispitne posude) i u njihovoj morfologiji (npr. otvorene rane), kao i prisutnost mladih jedinki. Za određivanje vrijednosti LC_{50} u pravilu je potrebno primijeniti probit-analizu (18) ili logističku regresiju. Međutim, u slučajevima u kojima je ta metoda analize neprikladna (npr. ako imamo manje od tri koncentracije koje uzrokuju djelomičnu smrtnost) mogu se primijeniti alternativne metode. To mogu biti metoda pomičnih prosjeka (19), modificirana Spearman-Karberova metoda (20) ili jednostavna interpolacija (npr. geometrijska sredina vrijednosti LC_0 i LC_{100}, izračunana množenjem drugog korijena vrijednosti LC_0 s vrijednošću LC_{100}).

43. Druga je krajnja točka plodnost (tj. broj nastalih mladih jedinki). Međutim, i tu je, kao i kod ispitivanja za određivanje raspona, u završnom izvješću potrebno navesti sve ostale znakove koji ukazuju na štetno djelovanje. Da bi se izračunali rezultati koji se odnose na razmnožavanje, za statističku je analizu potrebno znati aritmetičku sredinu $\bar{x}$ i standardnu devijaciju po tretmanu i po kontroli.

44. Ako je provedena analiza varijance, standardna devijacija (s) i stupnjevi slobode (df) mogu se zamijeniti procjenom zajedničke (engl. *pooled*) varijance dobivenom ANOVA-om i njezinim stupnjevima slobode – pod uvjetom da varijanca ne ovisi o koncentraciji. U tom se slučaju upotrebljavaju pojedinačne varijance kontrole i tretmana. Te se vrijednosti obično izračunavaju s pomoću komercijalno dostupnog statističkog računalnog programa, pri čemu se rezultati dobiveni po posudi upotrebljavaju kao ponavljanja. Ako se čini da je razumnije združiti podatke za negativnu kontrolu i kontrolu s otapalom nego izračunati rezultate uspoređujući ih s jednom od tih dviju kontrola, te je podatke potrebno testirati kako bi se provjerilo ima li među njima značajnih razlika (za odgovarajuće testove vidjeti stavak 47. i Dodatak 6.).

45. Daljnje statističko testiranje i zaključivanje ovisi o tome jesu li vrijednosti dobivene u ponavljanjima normalno distribuirane i jesu li im varijance homogene.

▼M6

Procjena NOEC-a

46. Poželjno je primijeniti snažne testove. Potrebno je koristiti se informacijama o tome jesu li podaci približno normalno distribuirani, npr. informacijama iz prijašnjeg iskustva s prstenastim ispitivanjem ili drugim podacima iz prethodno obavljenih ispitivanja. Od veće je važnosti homogenost varijance (homoskedastičnost). Iskustvo pokazuje da se varijanca često povećava kako se povećava srednja vrijednost. U tim bi se slučajevima homoskedastičnost mogla postići pretvorbom podataka. Međutim, ta se pretvorba mora temeljiti na podacima iz prethodno obavljenih ispitivanja, a ne na podacima koji se istražuju. S homogenim podacima potrebno je provesti t-testove višestruke usporedbe, kao što su Williamsov test (α = 0,05, jednosmjerni) (21) (22) ili u nekim slučajevima Dunnettov test (23) (24). Potrebno je napomenuti da se u slučaju nejednake replikacije moraju ispraviti tablične t-vrijednosti, kako to sugeriraju Dunnett i Williams. Ponekad zbog velike varijacije ne dolazi do redovitog povećanja/smanjenja odgovora. U slučaju takvog velikog odstupanja od monotoničnosti primjereniji je Dunnettov test. Ako postoje odstupanja od homoskedastičnosti, možda bi bilo uputno temeljitije istražiti moguće učinke na varijance kako bi se moglo utvrditi mogu li se t-testovi primijeniti, a da ne izgube mnogo na svojoj snazi (25). Alternativno se mogu primijeniti višestruki U-test, npr. Bonferronijev U-test prema Holmu (26) ili, kada podaci pokazuju heteroskedastičnost, ali su inače u skladu s temeljnim monotoničnim odnosom između doze i odgovora, neki drugi neparametarski test (npr. Jonckheere-Terpstra (27) (28) ili Shirley (29) (30)), kojima bi općenito trebalo davati prednost u odnosu na t-testove nejednake varijance. (Vidjeti i shemu u Dodatku 6.)

47. Ako je proveden granični test te su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost), može se primijeniti Studentov t-test parova, a u drugim slučajevima Mann-Whitneyjev U-test (31).

Procjena vrijednosti EC_x

48. Za izračunavanje bilo koje vrijednosti EC_x za regresijsku se analizu (linearnu ili nelinearnu) upotrebljavaju srednje vrijednosti po tretmanu, nakon što se dobije odgovarajuća funkcija doza-odgovor. Za rast gujavica kao kontinuirani odgovor, vrijednosti EC_x mogu se procijeniti odgovarajućom regresijskom analizom (32). Među prikladne funkcije za kvantalne podatke (smrtnost/preživljavanje i broj mladih jedinki) spadaju normalna sigmoidna funkcija, logistička funkcija ili Weibullova funkcija, koje sadržavaju dva do četiri parametra, od kojih neki mogu modelirati hermetičke odgovore. Ako je funkcija doza-odgovor prilagođena linearnom regresijskom analizom, značajni r^2 (koeficijent određivanja) i/ili nagib potrebno je odrediti regresijskom analizom prije procjene vrijednosti EC_x uvrštavanjem vrijednosti koja odgovara x-postotnoj kontrolnoj srednjoj vrijednosti u jednadžbu dobivenu regresijskom analizom. Granice pouzdanosti od 95 % izračunavaju se prema Fielleru (citirano u Finney (18)) ili u skladu s drugim odgovarajućim suvremenim metodama.

49. Druga je mogućnost da se odgovor modelira kao postotak ili dio parametra modela koji se tumači kao kontrolni srednji odgovor. U tim se slučajevima normalna (logistička, Weibullova) sigmoidna krivulja često može lako prilagoditi rezultatima primjenom probit-regresije (18). U tim se slučajevima ponderacijska funkcija mora prilagoditi metričkim odgovorima prema Christensenu (33). Međutim, ako je uočena hormeza, probit-analizu potrebno je zamijeniti logističkom ili Weibullovom funkcijom s četiri parametra prilagođenom nelinearnom regresijom (34). Ako se prikladna funkcija doza-odgovor ne može prilagoditi podacima, mogu se primijeniti alternativne metode za procjenu vrijednosti EC_x i njezinih granica pouzdanosti, kao što su metoda pomičnih prosjeka prema Thompsonu (19) i modificirana Spearman-Karberova metoda (20).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

50. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

▼M6

Ispitivana kemikalija:

— jasan opis ispitivane kemikalije, šarža, serija i CAS broj, čistoća,

— svojstva ispitivane kemikalije (npr. log Kow, topljivost u vodi, tlak pare, Henryjeva konstanta (H) i informacije o sudbini i ponašanju).

Ispitni organizmi:

— upotrijebljene ispitne životinje: vrsta, znanstveni naziv, izvor organizama i uvjeti uzgoja,

— starost, raspon veličina (mase) ispitnih organizama.

Uvjeti ispitivanja:

— detalji o pripremi ispitnog tla,

— maksimalan vodni kapacitet tla,

— opis metode primjene ispitivane kemikalije na tlo,

— pojedinosti o pomoćnim kemikalijama koje su upotrijebljene za primjenu ispitivane kemikalije,

— prema potrebi, podaci o kalibraciji opreme za raspršivanje,

— opis plana pokusa i radnog postupka,

— veličina ispitnih posuda i količina ispitnog tla,

— uvjeti ispitivanja: intenzitet svjetlosti, trajanje ciklusa svjetla i tame, temperatura,

— opis režima hranjenja, vrsta i količina hrane upotrijebljene u ispitivanju, datumi hranjenja,

— pH i sadržaj vode u tlu na početku i na kraju ispitivanja.

Rezultati ispitivanja:

— smrtnost (%) odraslih jedinki u svakoj ispitnoj posudi na kraju prva četiri tjedna ispitivanja,

— ukupna masa odraslih jedinki u svakoj ispitnoj posudi na početku ispitivanja,

— promjene tjelesne mase živih odraslih jedinki (% početne mase) u svakoj ispitnoj posudi nakon prva četiri tjedna ispitivanja,

— broj mladih u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja,

— opis očitih ili patoloških simptoma ili jasnih promjena ponašanja,

— rezultati dobiveni s referentnom ispitivanom kemikalijom,

— vrijednosti LC_{50}, NOEC i/ili EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za razmnožavanje, ako su neke od njih primjenjive, te njihovi intervali pouzdanosti, kao i graf prilagođenog modela upotrijebljenog za njihov izračun te sve informacije i opažanja korisna za tumačenje rezultata,

— grafički prikaz odnosa između doze i odgovora,

— rezultati dobiveni za svaku ispitnu posudu.

Odstupanja od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave tijekom ispitivanja.

LITERATURA

(1) Jaenicke, J. (1982.) *„Eisenia foetida"* is two biological species. Megadrilogica 4, 6 – 8.

(2) Oien, N. i Stenerson, J. (1984.) Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 – 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996.) Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. U: Riepert, F., Kula, C. (1996.): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, str. 50. – 82.

(4) Poglavlje C.8. ovog Priloga, Toksičnost za gujavice.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Ženeva.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No. 11268-1. ISO, Ženeva.

(7) SETAC (1998.) Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S. C., Bembridge, J. D., Holmstrup, M., i Posthuma, L. (ur.). SETAC Press, str. 456.

(8) EPA (1996.) Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, travanj 1996.

(9) Bouché, M. B. (1972.) Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C. A. (1983.) Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards, P. J. i Heimbach, F. (ur.) (1992.) Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C. A. i Bohlen, J. P. (1996.) Biology and ecology of Earthworms, 3. izdanje. Chapman and Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Ženeva.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. i Achazi, R. (2000.): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. U: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. i Eisentraeger, A. (ur.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59 – 81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992.) Soil Quality – Determination of water retention characteristics – Laboratory methods, No. 11274. ISO, Ženeva.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993.) Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Ženeva.

(17) Römbke, J. i Moser, Th. (1999.) Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, str. 150. + 223.

▼**M6**

(18) Finney, D. J. (1971.) Probit Analysis (3. izdanje), str. 19. – 76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D. J. (1978.) Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M. A., Russo, R. C. i Thurston, R. V. (1977.) Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714 – 719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D. A. (1971.) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D. A. (1972.) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C. W. (1955.) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C. W. (1964.) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der (1998.) Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S. (1979.): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954.); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133 – 145.

(28) Terpstra, T. J. (1952.); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327 – 333.

(29) Shirley, E. A. (1979.); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144 – 151.

(30) Williams, D. A. (1986.); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183 – 186.

(31) Sokal, R. R. i Rohlf, F. J. (1981.) Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2. izdanje. W. H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce, R. D. i Versteeg, D. J. (1992.) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E. R. (1984.) Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213 – 221.

(34) Van Ewijk, P. H. i Hoekstra, J. A. (1993.) Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25 – 32.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode primjenjuju se sljedeće definicije:

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

EC_x (koncentracija s učinkom od x %): koncentracija koja u određenom razdoblju izloženosti izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da proizvodi učinak na ispitivani parametar kod 50 % izložene populacije u definiranom razdoblju izloženosti. U ovom se ispitivanju koncentracije s učinkom iskazuju kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla ili kao masa ispitivane kemikalije po jediničnoj površini tla.

LC_0 (nesmrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju ne izaziva smrt nijednog izloženog ispitnog organizma. U ovom se ispitivanju LC_0 iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LC_{50} (srednja smrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju izaziva smrt 50 % izloženih ispitnih organizama. U ovom se ispitivanju LC_{50} iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla ili kao masa ispitivane kemikalije po jediničnoj površini tla.

LC_{100} (potpuno smrtonosna koncentracija): koncentracija ispitivane kemikalije koja u određenom razdoblju izaziva smrt 100 % izloženih ispitnih organizama. U ovom se ispitivanju LC_{100} iskazuje kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla.

LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom): najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja ima statistički značajan učinak ($p < 0,05$) U ovom se ispitivanju LOEC iskazuju kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla ili kao masa ispitivane kemikalije po jediničnoj površini tla. Sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a u pravilu moraju imati učinak koji se statistički razlikuje od kontrole. Svako odstupanje od navedenoga mora biti obrazloženo u izvješću o ispitivanju.

NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka): najviša koncentracija ispitivane kemikalije neposredno ispod LOEC-a kod koje nije uočen nikakav učinak. U ovom ispitivanju koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u određenom razdoblju izloženosti u usporedbi s kontrolom.

Stopa razmnožavanja: srednji broj mladih gujavica dobivenih od određenog broja odraslih gujavica u razdoblju ispitivanja.

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

▼M6

Dodatak 2.

Određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta tla

Pokazalo se da je sljedeća metoda prikladna za određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta tla. Opisana je u Prilogu C normi ISO DIS 11268-2 (1).

Odgovarajućom napravom (npr. svrdlom s epruvetom) uzme se određena količina (npr. 5 g) tla koje služi kao ispitni supstrat. Dno epruvete prekrije se komadom filtarskog papira te se nakon punjenja vodom epruveta postavi na stalak u vodenoj kupelji. Epruvetu je potrebno postupno uranjati sve dok razina vode ne bude iznad gornjeg dijela tla. Potom je treba ostaviti u vodi tri sata. Budući da tlo ne može zadržati svu vodu koju apsorbira kapilarama, uzorak tla potrebno je ostaviti dva sata da se ocijedi tako što se epruveta postavi na podlogu od vrlo mokrog fino usitnjenog kremenog pijeska u zatvorenoj posudi (da se spriječi sušenje). Uzorak je potom potrebno izvagati i osušiti do stalne mase na 105 °C. Vodni kapacitet (WHC) potom se može izračunati kako slijedi:

$$\text{WHC (u postotku suhe mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

gdje je:

S = supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filtarskog papira,

T = tara (masa epruvete + masa filtarskog papira),

D = suha masa supstrata.

UPUĆIVANJA:

(1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Ženeva.

▼**M6**

Dodatak 3.

Određivanje ph-vrijednosti tla

Sljedeća metoda za određivanje pH-vrijednosti tla temelji se na opisu navedenom u normi ISO DIS 10390: Kakvoća tla – Određivanje pH-vrijednosti (1).

Definirana količina tla suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Potom se tlo (najmanje 5 grama) suspendira u pet puta većoj količini 1 M otopine kalijeva klorida (KCl) analitičkog stupnja čistoće ili 0,01 M otopine kalcijeva klorida ($CaCl_2$) analitičkog stupnja čistoće. Suspenzija se potom temeljito protresa pet minuta te se ostavi da se taloži najmanje dva sata, ali ne dulje od 24 sata. Potom se pH-vrijednost tekuće faze izmjeri pH-metrom koji se prije svakog mjerenja kalibrira s pomoću odgovarajućeg niza puferskih otopina (npr. pH 4,0 i 7,0).

UPUĆIVANJA:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Kakvoća tla – Određivanje pH-vrijednosti, No. 10390. ISO, Ženeva.

▼M6

Dodatak 4.

Uzgoj *Eisenia fetida / Eisenia andrei*

Ove bi vrste trebalo po mogućnosti uzgajati u klimatskim komorama na temperaturi od 20 °C ± 2 °C. Pri ovoj temperaturi i uz dovoljno hrane gujavice postaju zrele nakon otprilike dva do tri mjeseca.

Obje se vrste mogu uzgajati u širokom rasponu životinjskog otpada. Preporučeni medij za uzgoj je mješavina konjskog ili kravljeg gnoja i treseta u omjeru 50: 50. Potrebno je izvršiti provjere kako bi se osiguralo da se krave ili konji čiji je gnoj prikupljen ne liječe ili tretiraju kemikalijama poput pospješivača rasta, nematicida ili sličnih veterinarskih proizvoda koji bi mogli štetno utjecati na gujavice tijekom ispitivanja. Preporučuje se izravno prikupiti kravlji gnoj iz „ekološkog” izvora, jer je iskustvo pokazalo da kravlji gnoj dostupan na tržištu kao vrtno gnojivo može imati štetne učinke na gujavice. Medij mora imati pH-vrijednost oko 6 do 7 (regulira se kalcijevim karbonatom), imati nisku ionsku provodljivost (manje od 6 mg ili 0,5 % koncentracije soli) i ne smije biti prekomjerno onečišćen amonijakom ili životinjskim urinom. Supstrat bi trebao biti vlažan, ali ne previše mokar. Prikladne su kutije za uzgoj volumena od 10 do 50 litara.

Da bi se dobili crvi standardne starosti i veličine (mase), najbolje je uzgoj započeti s kokonima. Nakon što se kultura uspostavi, održava se tako da se odrasle gujavice stavljaju u uzgojnu kutiju napunjenu svježim supstratom i u njoj drže 14 do 28 dana kako bi se mogli razviti novi kokoni. Odrasle se gujavice zatim vade, a mlade jedinke izležene iz kokona upotrebljavaju se kao osnova za sljedeću kulturu. Gujavice se kontinuirano hrane životinjskim otpadom i s vremena na vrijeme prenose u sveži supstrat. Iskustvo je pokazalo da su zobeno brašno ili fino usitnjena kravlja ili konjska balega osušena na zraku prikladna hrana. Potrebno je provjeriti da se krave ili konji čiji je gnoj prikupljen ne liječe kemikalijama, kao što su pospješivači rasta, koje bi mogle štetno utjecati na gujavice tijekom dugotrajnog uzgoja. Gujavice koje se izlegnu iz kokona upotrebljavaju se za ispitivanje kada su stare između dva mjeseca i 12 mjeseci te kada se smatra da su odrasle.

Može se smatrati da su gujavice zdrave ako se kreću kroz supstrat, ne pokušavaju izići iz supstrata i neprekidno se razmnožavaju. Ako se gujavice sporo kreću i stražnji im je dio žute boje, znači da je supstrat iscrpljen. U tom se slučaju preporučuje staviti svježi supstrat i/ili smanjiti gustoću populacije u kutijama.

▼M6

Dodatak 5.

Tehnike brojenja mladih gusjenica koje su se izlegle iz kokona

Ručno razvrstavanje gujavica iz supstrata zahtijeva dosta vremena. Stoga se preporučuju dvije druge metode:

(a) Ispitne se posude stave u vodenu kupelj, čija se početna temperatura od 40 °C povećava do 60 °C. Nakon dvadesetak minuta mlade bi se gujavice trebale pojaviti na površini supstrata, odakle ih je jednostavno izvaditi i izbrojiti.

(b) Ispitno se tlo može isprati kroz sito metodom koju su razvili van Gestel i sur. (1), pod uvjetom da su treset i gnoj ili zobeno brašno usitnjeni u fini prah. Dva sita veličine otvora od 0,5 mm (promjera 30 cm) postavljaju se jedno na drugo. Sadržaj ispitne posude ispire se kroz sita pod snažnim mlazom vode iz slavine, pri čemu mlade gujavice i kokoni ostaju uglavnom na gornjem situ. Važno je napomenuti da tijekom ovog postupka cijela površina gornjeg sita mora biti mokra tako da mlade gujavice plutaju na tankom sloju vode, čime se sprječava da odgmižu kroz otvore sita. Najbolji se rezultati postižu kada se upotrijebi tuš.

Nakon što se cijeli supstrat ispere kroz sito, mlade gujavice i kokoni mogu se isprati iz gornjeg sita u zdjelu. Potom se sadržaj zdjele pusti da odstoji sve dok prazni kokoni ne počnu plutati po površini vode, a puni kokoni i mlade gujavice potonu na dno. Tada se voda iz zdjele može izliti, a mlade gujavice i kokoni prenijeti u Petrijevu zdjelicu napunjenu malom količinom vode. Da bi im se odredio broj, gujavice se mogu izvaditi iglom ili pincetom.

Iskustvo je pokazalo da je metoda (a) prikladnija za ekstrakciju mladih jedinki koje bi mogle biti isprane čak i kroz sito s otvorima od 0,5 mm.

Potrebno je uvijek utvrditi učinkovitost metode koja se primjenjuje za vađenje gujavica (i prema potrebi kokona) iz supstrata. Ako se mlade jedinke vade ručnim razvrstavanjem, preporučljivo je postupak izvesti dva puta na svim uzorcima.

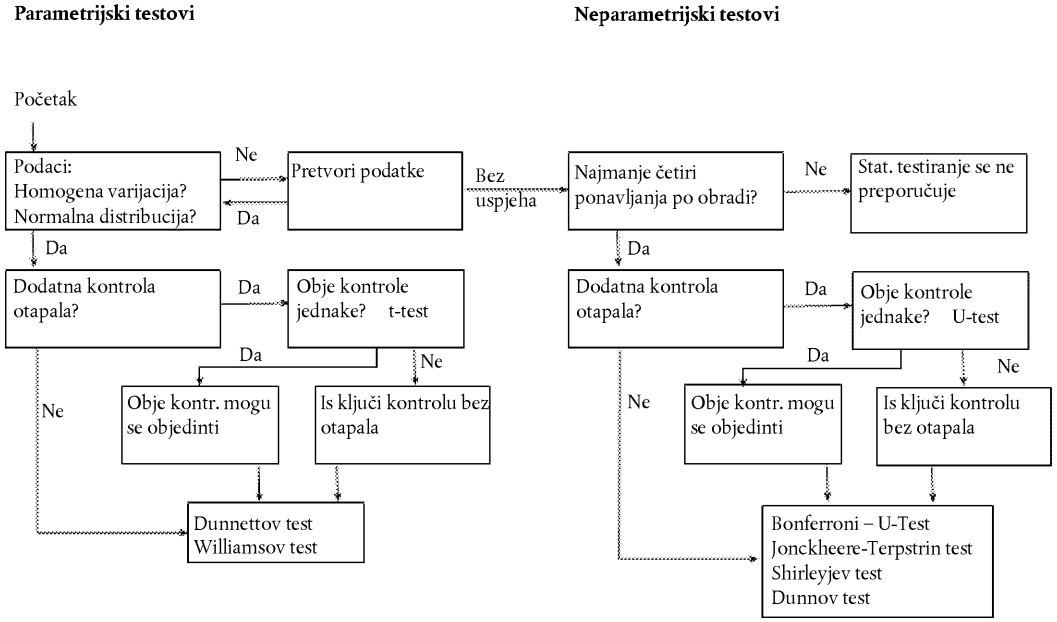
UPUĆIVANJA:

(1) C. A. M. Van Gestel, W. A. van Dis, E. M. van Breemen, P. M. Sparenburg (1988.) Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Dodatak 6.

Pregled statističke procjene podataka (određivanje NOEC-a)



▼M6

C.34. ODREĐIVANJE INHIBICIJE DJELOVANJA ANAEROBNIH BAKTERIJA – SMANJENJE PROIZVODNJE PLINA IZ ANAEROBNE RAZGRADNJE (OTPADNIH VODA) MULJA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 224 (2007.). Kemikalije ispuštene u vodeni okoliš prolaze kroz aerobne i anaerobne zone u kojima se mogu razgraditi i/ili mogu inhibirati djelovanje bakterija; u nekim slučajevima u anaerobnim zonama mogu ostati neporemećene desetljećima ili dulje. Kod obrade otpadnih voda prva je faza, prethodno taloženje, aerobna u supernatantu i anaerobna u istaloženom mulju. Potom u drugoj fazi nastaje aerobna zona u aeracijskom bazenu s aktivnim muljem te anaerobna zona u istaloženom mulju u naknadnom taložniku. Mulj iz obje navedene faze obično se podvrgava anaerobnoj obradi pri kojoj nastaju metan i ugljikov dioksid koji se uglavnom upotrebljavaju za proizvodnju električne energije. U širem će okolišu kemikalije koje dospiju u sedimente u zaljevima, ušćima i moru najvjerojatnije trajno ostati u tim anaerobnim zonama, ako nisu biorazgradive. Neke će kemikalije u većim količinama dospjeti u te zone zbog svojih fizikalnih svojstava, kao što su slaba topljivost u vodi, visoka adsorpcija na suspendirane krute tvari te nemogućnost aerobne razgradnje.

2. Iako je poželjno da kemikalije koje se ispuštaju u okoliš budu biorazgradive i u aerobnim i u anaerobim uvjetima, ključno je da te kemikalije ne inhibiraju djelovanje mikroorganizama ni u jednoj od tih zona. U Ujedinjenoj Kraljevini bilo je nekoliko slučajeva potpune inhibicije proizvodnje metana uzrokovane, na primjer, pentaklorfenolom iz industrijskih ispusta, što je dovelo do vrlo visokih troškova odvoza inhibiranog mulja iz digestora na „sigurna” mjesta te dovoženja zdravog mulja iz susjednih postrojenja. Međutim, brojni su slučajevi u kojima nekoliko drugih kemikalija, uključujući alifatske halogene ugljikovodike (kemijsko čišćenje) i deterdžente, uzrokuju poremećaje u razgradnji koji su manje ozbiljni, ali značajno slabe učinkovitost digestora.

3. Samo se jedna ispitna metoda, C.11. (1), bavi inhibicijom djelovanja bakterija (Disanje aktivnog mulja) i njome se procjenjuje učinak ispitivanih kemikalija na brzinu potrošnje kisika u prisutnosti supstrata. Ta je metoda u širokoj primjeni za rano upozoravanje na moguće štetne učinke kemikalija na aerobnu obradu otpadnih voda te za određivanje neinhibitornih koncentracija ispitivanih kemikalija koje će se upotrebljavati u različitim testovima biorazgradivosti. Ispitna metoda C.43. (2) nudi ograničenu mogućnost određivanja toksičnosti ispitivane kemikalije za proizvodnju plina iz anaerobnog mulja, razrijeđenog do jedne desetine njegove normalne koncentracije krutih tvari kako bi se postigla potrebna preciznost u procjeni postotka biorazgradnje. S obzirom na to da razrijeđeni mulj može biti osjetljiviji na inhibitorne kemikalije, grupacija ISO odlučila je pripremiti metodu u kojoj se upotrebljava nerazrijeđeni mulj. Proučena su najmanje tri teksta (iz Danske, Njemačke i Ujedinjene Kraljevine) te su na kraju pripremljene dvije ISO norme, jedna u kojoj se upotrebljava nerazrijeđeni mulj, ISO 13 641-1 (3), i druga u kojoj se upotrebljava mulj razrijeđen sto puta, ISO 13 641-2 (4), kako bi predstavljao blata i sedimente s malim bakterijskim populacijama. Obje su metode bile podvrgnute prstenastom ispitivanju (5); prva je bila potvrđena kao prihvatljiva norma, dok je oko druge bilo neslaganja. Ujedinjena Kraljevina smatrala je da je metodu potrebno dodatno istražiti s obzirom na to da je značajan broj sudionika prijavio vrlo malu ili nikakvu proizvodnju plina, djelomično zbog toga što je postotak plinskog prostora bio previsok (75 %) za optimalnu osjetljivost.

4. U prijašnjim radovima objavljenima u Ujedinjenoj Kraljevini (6) (7) opisana je manometrijska metoda u kojoj se upotrebljava nerazrijeđeni mulj, plus sirovi kanalizacijski mulj kao supstrat, u tikvicama od 500 ml; aparatura je bila nezgrapna, a smrad sirovog mulja bio je oduran. Kasnije su kompaktniju i praktičniju aparaturu koju su razvili Shelton i Tiedje (8) te poboljšali

▼M6

Battersby i Wilson (9) uspješno primijenili Wilson i sur. (10). Kawahara i sur. (11) uspješno su u laboratoriju pripremili homogenije muljeve za uporabu u ispitivanjima anaerobne biorazgradivosti i inhibicije na brojnim kemikalijama. Isto tako, sirovi mulj kao supstrat zamijenjen je kako bi se test proveo s anaerobnim muljem razrijeđenim sto puta ili s blatom, sedimentima itd. niske bakterijske aktivnosti.

5. Ova metoda može pružiti korisne informacije za predviđanje vjerojatnog učinka ispitivane kemikalije na proizvodnju plina u anaerobnim digestorima. Međutim, jedino dulja ispitivanja kojima se vjernije simulira funkcioniranje digestora mogu pokazati može li doći do prilagodbe mikroorganizama ispitivanoj kemikaliji ili mogu li kemikalije koje će se vjerojatno apsorbirati ili adsorbirati na mulj doseći toksičnu koncentraciju u razdoblju duljem od onog koje je ispitano u ovom testu.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Alikvote smjese anaerobnog mulja (od 20 g/l do 40 g/l ukupnih krutih tvari) i otopine razgradivog supstrata inkubiraju se pojedinačno i istodobno kad i niz koncentracija ispitivane kemikalije u nepropusno zatvorenim posudama do tri dana. Količina proizvedenog plina (metan plus ugljikov dioksid) mjeri se povećanjem tlaka (Pa) u bocama. Postoci inhibicije proizvodnje plina koji se mogu pripisati različitim koncentracijama ispitivane kemikalije izračunavaju se iz količina proizvedenih u odgovarajućim ispitnim i kontrolnim bocama. EC_{50} i druge učinkovite koncentracije izračunavaju se iz grafičkih prikaza postotka inhibicije u ovisnosti o koncentraciji ispitivanih kemikalija ili, češće, njezinu logaritmu.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

7. Ispitivane se kemikalije obično moraju upotrebljavati u najčišćem lako dostupnom obliku, jer nečistoće u nekim kemikalijama, npr. klorofenoli, mogu biti znatno toksičnije od same ispitivane kemikalije. Međutim, potrebno je uzeti u obzir i potrebe da se kemikalije ispitaju u obliku u kojemu su proizvedene / komercijalno dostupne. Uporaba formuliranih proizvoda načelno se ne preporučuje, ali za slabo topljive ispitivane kemikalije može biti primjereno upotrijebiti formulirani materijal. Svojstva ispitivane kemikalije koja je potrebno poznavati uključuju topljivost u vodi i nekim organskim otapalima, tlak para, koeficijent adsorpcije, hidrolizu i biorazgradivost u anaerobnim uvjetima.

PRIMJENJIVOST METODE

8. Test se može primijeniti kod kemikalija koje su topljive ili netopljive u vodi, uključujući hlapljive kemikalije. Međutim, potreban je poseban oprez u slučaju materijala niske topljivosti u vodi (vidjeti referencu (12)) i visokog stupnja hlapljivosti. Mogu se upotrijebiti i inokulumi podrijetlom s drugih anaerobnih mjesta, npr. blata, zasićenih tala, sedimenata. Anaerobni bakterijski sustavi koji su prethodno bili izloženi toksičnim kemikalijama mogu se prilagoditi tako da zadrže svoju aktivnost i u prisutnosti ksenobiotika. Inokulumi iz prilagođenih bakterijskih sustava mogu pokazivati veću toleranciju na ispitivane kemikalije u usporedbi s inokulumima iz neprilagođenih sustava.

REFERENTNE KEMIKALIJE

9. Radi provjere postupka, u okviru uobičajenog ispitivanja paralelno se ispituje referentna kemikalija u odgovarajućim posudama; pokazalo se da je 3,5-diklorfenol tipičan inhibitor anaerobne proizvodnje plina, kao i potrošnje kisika aktivnog mulja te drugih biokemijskih reakcija. Pokazalo se da su u usporedbi s 3,5-diklorfenolom druge dvije kemikalije veći inhibitori proizvodnje metana, i to metilen bis-tiocijanat i pentaklorfenol, ali rezultati dobiveni s njima nisu validirani. Pentaklorfenol se ne preporučuje jer nije lako dostupan u čistom obliku.

▼M6

OBNOVLJIVOST REZULTATA

10. U međunarodnom prstenastom testu (5) kod deset je laboratorija koji su sudjelovali u njemu dobivena tek osrednja obnovljivost vrijednosti EC_{50} za 3,5-diklorfenol i 2-bromoetan sulfonsku kiselinu. (Za prvu je kemikaliju raspon iznosio od 32 mg/l do 502 mg/l, za drugu od 220 mg/l do 2 190 mg/l.)

Broj laboratorija	Kao mg/l			Kao mg/g mulja		
	srednja vrijednost	s. d.	cv (%)	srednja vrijednost	s. d.	cv (%)
	3,5-diklorfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetan sulfonska kiselina					
10	1 058	896	85	34	26	76

Podaci za EC_{50} iz prstenastog testa – nerazrijeđeni mulj

11. Visoki koeficijent varijacije među laboratorijima u velikoj mjeri odražava razlike u osjetljivosti mikroorganizama u mulju koje su rezultat prethodne izloženosti ili neizloženosti ispitivanoj kemikaliji ili drugim kemijski srodnim kemikalijama. Preciznost kojom je određena vrijednost EC_{50} koja se temelji na koncentraciji mulja bila je tek nešto bolja od one postignute za „volumetrijsku" vrijednost (mg/l). U tri laboratorija koja su navela preciznost svojih vrijednosti EC_{50} za 3,5-diklorfenol koeficijenti varijacije bili su znatno niži (22, 9 i 18 % za EC_{50} mg/g) od onih za srednje vrijednosti svih deset laboratorija. Pojedinačne srednje vrijednosti za ta tri laboratorija iznosile su 3,1, 3,2 i 2,8 mg/g. Niži, prihvatljivi koeficijenti varijacije unutar laboratorija u usporedbi sa znatno višim koeficijentima među vrijednostima različitih laboratorija, to jest od 9 do 22 % u usporedbi s 92 %, ukazuju na to da postoje značajne razlike u svojstvima pojedinih muljeva.

OPIS METODE

Aparatura

12. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema te sljedeće:

a) inkubator – koji ne iskri i termostatiran je na 35 °C ± 2 °C;

b) staklene ispitne posude otporne na tlak odgovarajuće nazivne veličine ([1]), opremljene plinonepropusnim obloženim septumom, koji može podnijeti tlak od oko 2 bara ili 2×10^5 Pa (za oblaganje se upotrebljava npr. PTFE = politetrafluoretilen). Preporučuju se staklene serum boce nazivnog obujma 125 ml i stvarnog obujma oko 160 ml, začepljene septumom namijenjenim serum-bocama ([2]) i aluminijskim prstenom na navoj; uspješno se mogu upotrijebiti i boce ukupnog obujma između 0,1 i 1 litre;

([1]) Preporučuje se veličina od 0,1 litre do 1 litre.

([2]) Preporučuje se uporaba plinonepropusnih silikonskih septuma. Nadalje, preporučuje se ispitati plinonepropusnost čepova, posebno septuma od butilnog kaučuka, jer nekoliko septuma koji se mogu nabaviti na tržištu nije dovoljno plinonepropusno kad je riječ o metanu, a neki septumi nisu više nepropusni kad ih se probuši iglom u uvjetima ispitivanja.

— Preporučuju se plinonepropusni obloženi septumi, koji se moraju upotrebljavati za hlapljive kemikalije (neki komercijalni septumi relativno su tanki, tanji od 0,5 cm, i nisu više plinonepropusni kad ih se probuši injekcijskom iglom).

— Septumi od butilnog kaučuka (oko 1 cm) preporučuju se ako ispitivane tvari nisu hlapljive (obično su plinonepropusni i nakon što ih se probuši).

— Preporučuje se da se prije ispitivanja pažljivo provjeri ostaju li septumi plinonepropusni i nakon bušenja.

▼M6

c) precizni mjerač tlaka ([1]) i dodatak s iglama

Ukupna proizvodnja plina (metana plus ugljikovog dioksida) mjeri se mjeračem tlaka prilagođenim za mjerenje i ispuštanje proizvedenog plina. Prikladan je instrument na primjer ručni precizni mjerač tlaka spojen s injekcijskom iglom; trokraki plinonepropusni ventil omogućuje ispuštanje viška tlaka (Dodatak 1.). Potrebno je da unutarnja zapremnina cijevi i ventila pretvornika tlaka bude što je moguće niža, kako pogreške do kojih dolazi zbog zanemarivanja volumena opreme ne bi bile značajne;

d) izolirane posude za prijevoz razgrađujućeg mulja;

e) trokraki tlačni ventili;

f) sito kvadratnih otvora veličine 1 mm;

g) spremnik za mulj koji se razgrađuje, boca od stakla ili polietilena visoke gustoće, zapremnine od oko 5 litara, opremljena miješalicom i napravom koja omogućuje prolazak struje plinovitog dušika (vidjeti stavak 13.) kroz plinski prostor;

h) membranski filtri (0,2 μm) za steriliziranje supstrata;

i) mikrošprice za plinonepropusno povezivanje pretvornika tlaka (vidjeti stavak 12. točku (c)) s plinskim prostorom u bocama (vidjeti stavak 12. točku (b)); služe i za dodavanje netopljivih tekućih ispitnih materijala u boce;

j) komora za rukovanje s pomoću rukavica („glove box”), nije obvezatna, ali se preporučuje, s blagim pozitivnim tlakom dušika.

Reagensi

13. Tijekom cijelog testa potrebno je upotrebljavati reagense analitičke čistoće. Uvijek se mora upotrebljavati plinoviti dušik visoke čistoće s udjelom kisika manjim od 5 μl/l.

Voda

14. Ako je u bilo kojoj fazi potrebno razrjeđivanje, upotrebljava se deionizirana, odzračena voda. Nisu potrebne analitičke kontrole te vode, ali se mora osigurati da je uređaj za deioniziranje redovito održavan. Deionizirana voda upotrebljava se i za pripremu radnih otopina. Prije nego što se u bilo koju otopinu ili razrjeđenje ispitnog materijala doda anaerobni inokulum, potrebno je osigurati da u njima nema kisika. To se možete učiniti upuhivanjem plinovitog dušika kroz vodu za razrjeđivanje (ili kroz razrjeđenja) tijekom jednog sata prije dodavanja inokuluma ili zagrijavanjem vode za razrjeđivanje do točke vrelišta i njezinim hlađenjem na sobnu temperaturu u atmosferi bez kisika.

Razgrađeni mulj

15. Mulj koji se aktivno razgrađuje uzme se iz digestora u postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda u kojemu se pretežno pročišćavaju komunalne otpadne vode ili alternativno iz laboratorijskog digestora. Praktične informacije o mulju iz laboratorijskog digestora mogu se pronaći u literaturi (11). Ako se namjerava upotrijebiti prilagođeni inokulum, može se predvidjeti uzimanje mulja koji se razgrađuje iz postrojenja za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda. Za prikupljanje mulja upotrebljavaju se boce širokog

([1]) Mjerač je potrebno upotrebljavati i redovito umjeravati u skladu s uputama proizvođača. Ako se upotrebljava mjerač tlaka propisane kvalitete, npr. kapsuliran čeličnom membranom, nije potrebno umjeravanje u laboratoriju. Umjeravanje mora izvršavati ovlaštena ustanova u preporučenim intervalima. Točnost umjeravanja može se provjeriti u laboratoriju mjerenjem u jednoj točki pri 1×10^5 Pa mjeračem tlaka s mehaničkim pokazivačem. Ako je ta točka ispravno izmjerena, znači da je i linearnost nepromijenjena. Ako se upotrebljavaju drugi mjerni uređaji (bez ovjerenog umjeravanja koje je obavio proizvođač), preporučuje se konverzija u cijelom rasponu u redovitim intervalima (Dodatak 2.).

▼M6

grla, izrađene od polietilena visoke gustoće ili sličnog materijala, koje se mogu širiti. Boce za uzorkovanje napune se muljem do visine od oko 1 cm od vrha boce, hermetički zatvore, po mogućnosti s pomoću sigurnosnog ventila (stavak 12. točka (e)), i stave u izolirane posude (stavak 12. točka (d)) kako bi se smanjio temperaturni šok te se drže u njima do prebacivanja u inkubator termostatiran na 35 °C ± 2 °C. Pri otvaranju boca potrebno je ispustiti višak tlaka plina pažljivim i postupnim otvaranjem čepa ili s pomoću trokrakog ventila za ispuštanje tlaka (stavak 12. točka (e)). Poželjno je upotrijebiti mulj u roku od nekoliko sati od prikupljanja, a u protivnom se pohranjuje na 35 °C ± 2 °C pod plinskim prostorom napunjenim dušikom do tri dana, kada obično dolazi do malog gubitka aktivnosti.

Upozorenje – Mulj koji se razgrađuje proizvodi zapaljive plinove koji predstavljaju opasnost od požara i eksplozije: sadržava i potencijalno patogene organizme, stoga poduzmite odgovarajuće mjere opreza pri rukovanju muljem. Zbog sigurnosnih razloga ne upotrebljavajte staklene posude za prikupljanje mulja.

Inokulum

16. Neposredno prije uporabe mulj se blago promiješa te prosije kroz sito s otvorima veličine 1 mm^2 (stavak 12. točka (f)) u prikladnu bocu (stavak 12. točka (g)), kroz čiji se plinski prostor pušta struja dušika. Uzme se uzorak za mjerenje koncentracije ukupne suhe tvari (vidjeti npr. ISO 11 923 (13) ili istovrijednu normu EU-a). Općenito, mulj se upotrebljava bez razrjeđivanja. Koncentracija krutih tvari obično iznosi između 2 % i 4 % (w/v). Provjeri se pH-vrijednost mulja i prema potrebi prilagodi na 7 ± 0,5.

Ispitni supstrat

17. Otopi se 10 g hranjivog bujona (npr. Oxoid), 10 g ekstrakta kvasca i 10 g D-glukoze u deioniziranoj vodi te razrijedi do 100 ml. Sterilizira se filtriranjem kroz membranski filtar od 0,2 μm (stavak 12. točka (h)) i odmah se upotrijebi ili pohrani na 4 °C najdulje jedan dan.

Ispitivana kemikalija

18. Pripremi se posebna radna otopina za svaku kemikaliju topljivu u vodi tako da sadržava npr. 10 g/l kemikalije u vodi za razrjeđivanje bez kisika (stavak 14.). Odgovarajući volumeni tih radnih otopina upotrijebe se za pripremanje reakcijskih smjesa koje sadržavaju gradirane koncentracije. Druga je mogućnost da se pripremi niz razrjeđenja svake radne otopine tako da volumen koji se doda u ispitne boce bude jednak za svaku potrebnu konačnu koncentraciju. pH-vrijednost radnih otopina prema potrebi se prilagodi na 7 ± 0,2.

19. Za ispitivane kemikalije koje su nedovoljno topljive u vodi pogledati normu ISO 10 634 (12) ili istovrijednu normu EU-a. Ako je potrebno upotrijebiti organsko otapalo, izbjegavaju se otapala kao što su kloroform i ugljikov tetraklorid, za koje je poznato da snažno inhibiraju proizvodnju metana. Pripremi se otopina odgovarajuće koncentracije kemikalije netopljive u vodi u prikladnom hlapljivom otapalu, na primjer acetonu ili dietil-eteru. Potrebni volumeni otopine s otapalom dodaju se u prazne ispitne boce (stavak 12. točka (b)) te otapalo ispari prije dodavanja mulja. Za ostale obrade treba slijediti normu ISO 10 634 (12) ili istovrijednu normu EU-a, ali treba biti na oprezu jer svaki surfaktant koji se upotrebljava za stvaranje emulzija može inhibirati anaerobnu proizvodnju plina. Ako se smatra da prisutnost organskih otapala i emulgatora uzrokuje artefakte, ispitivana se kemikalija može dodati izravno u ispitnu smjesu u obliku praha ili tekućine. Hlapljive kemikalije i tekuće ispitivane kemikalije koje nisu topljive u vodi mogu se ubrizgati u inokulirane serum-boce s pomoću mikrošprica (stavak 12. točka (i)).

▼M6

20. Ispitivane kemikalije dodaju se u boce tako da se dobije geometrijski niz koncentracija, na primjer 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l i 15,6 mg/l. Ako raspon toksičnosti nije poznat iz podataka o sličnim kemikalijama, prvo se provede preliminarno ispitivanje za određivanje raspona na koncentracijama od 1 000 mg/l, 100 mg/l i 10 mg/l kako bi se utvrdio odgovarajući raspon.

Referentna kemikalija

21. Pripremi se vodena otopina 3,5-diklorfenola (10 g/l) postupnim dodavanjem minimalne količine od 5 mol/l otopine natrijeva hidroksida krutoj tvari, uz protresanje, dok se krutina ne otopi. Zatim se doda voda za razrjeđivanje iz koje je uklonjen kisik (stavak 14.) da se dobije potreban volumen; otapanje se može poboljšati sonikacijom. Druge se referentne kemikalije mogu upotrijebiti ako je u najmanje tri testa s različitim inokulumima (različiti izvori ili različita vremena prikupljanja) dobiven prosječni raspon vrijednosti EC_{50}.

INTERFERENCIJA/POGREŠKE

22. Neki bi sastojci mulja vjerojatno mogli reagirati s mogućim inhibitorima te ih učiniti nedostupnima mikroorganizmima i tako dovesti do niže ili nulte inhibicije. Isto tako, ako mulj već sadržava kemikaliju koja ima inhibitorni učinak, ispitivanjem s tom kemikalijom mogli bi se dobiti pogrešni rezultati. Osim navedenih mogućnosti, postoji čitav niz identificiranih faktora koji mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Navedeni su u Dodatku 3., zajedno s metodama uklanjanja ili barem smanjenja pogrešaka.

POSTUPAK ISPITIVANJA

23. Broj potrebnih ponavljanja ovisi o stupnju preciznosti koji je potreban za inhibicijske indekse. Ako su brtve na bocama dovoljno plinonepropusne tijekom cijelog ispitivanja, za svaku se potrebnu koncentraciju postavi se samo jedna serija (najmanje tri ponavljanja) ispitnih boca. Isto tako, pripremi se jedna serija boca s referentnom kemikalijom i jedan set kontrola. Međutim, ako su brtve na bocama pouzdane samo za jedno ili nekoliko bušenja, serija ispitnih boca (npr. tri ponavljanja) postavi se za svaki interval (t) za koji se traže rezultati za sve koncentracije ispitivane kemikalije koje treba ispitati. Isto tako, pripreme se „t” serije boca za referentnu kemikaliju i za kontrole.

24. Preporučuje se uporaba komore za rukovanje s pomoću rukavica (stavak 12. točka (j)). Najmanje 30 minuta prije početka ispitivanja kroz komoru za rukovanje s pomoću rukavica koja sadržava svu potrebnu opremu pusti se mlaz plinovitog dušika. Potrebno je osigurati da tijekom rukovanja i hermetičkog zatvaranja boca temperatura mulja iznosi 35 °C ± 2 °C.

Preliminarno ispitivanje

25. Ako je aktivnost mulja nepoznata, preporučuje se provođenje preliminarnog ispitivanja. Pripreme se kontrole s koncentracijama suhe tvari od na primjer 10 g/l, 20 g/l i 40 g/l plus supstrat, ali bez ispitivane kemikalije. Isto tako, upotrijebe se različiti volumeni reakcijske smjese kako bi se dobila tri ili četiri omjera volumena plinovitog prostora i volumena tekućine. Na temelju rezultata o volumenu proizvedenog plina u različiti vremenskim intervalima biraju se najprikladniji uvjeti koji omogućuju dva dnevna mjerenja pri kojima se javljaju značajni volumeni plina i ispuštanje tlaka dnevno pri optimalnoj osjetljivosti ([1]) bez opasnosti od eksplozije.

Dodavanje ispitivanih kemikalija

26. Ispitivane kemikalije topljive u vodi dodaju se u prazne ispitne boce (stavak 12. točka (b)) u obliku vodenih otopina (stavak 18.). Upotrijebe se setovi

([1]) To se primjenjuje na plan pokusa i uvjete pokusa u kojima se volumen proizvedenog plina – iz slijepih proba i posuda koje pokazuju inhibiciju od 70 do 80 % – može procijeniti uz prihvatljive granice dopuštenih pogrešaka.

▼M6

boca koji obuhvaćaju najmanje tri ponavljanja za svaku koncentraciju iz određenog raspona (stavak 20.). Ako je riječ o netopljivim ili slabo topljivim ispitivanim kemikalijama, njihove otopine u organskim otapalima ubrizgavaju se mikrošpricom u prazne boce kako bi se dobila serija ponavljanja pet koncentracija ispitivane kemikalije. Otapalo se ispari puštanjem mlaza plinovitog dušika preko površine otopina u ispitnim bocama. Druga je mogućnost da se odmjerene količine netopljivih krutih kemikalija dodaju izravno u ispitne boce.

27. Ako se netopljive i slabo topljive tekuće ispitne kemikalije ne dodaju s pomoću otapala, potrebno ih je dodati mikrošpricom izravno u ispitne boce nakon dodavanja inokuluma i ispitnog supstrata (vidjeti stavak 30.). Na isti se način mogu dodati hlapljive ispitivane kemikalije.

Dodavanje inokuluma i supstrata

28. Odgovarajuća količina prosijanog mulja koji se razgrađuje promiješa se (vidjeti stavak 16.) u boci od 5 l (stavak 12. točka (g)), kroz čiji se plinski prostor pušta struja plinovitog dušika. Ispitne boce koje sadržavaju vodenu otopinu ispitivane kemikalije ili otopinu ispitivane kemikalije u isparenom otapalu ispiru se strujom plinovitog dušika oko dvije minute da se ukloni zrak. Alikvote, npr. 100 ml, dobro promiješanog mulja dodaju se u ispitne boce pipetom s velikim nastavkom ili s pomoću mjernog cilindra. Ključno je odjednom napuniti pipetu točno potrebnom količinom mulja, jer se krute tvari u mulju lako talože. Ako se uzme više, pipetu je potrebno isprazniti i početi ispočetka.

29. Zatim se doda dovoljno otopine supstrata (stavak 17.) da se dobije koncentracija od 2 g/l svakog sastojaka u smjesi, hranjivog bujona, ekstrakta kvasca i D-glukoze, dok i dalje traje ispiranje dušikom. U nastavku je naveden primjer ispitnih serija.

Konačna masena koncentracija ispitivane kemikalije u ispitnim bocama (mg/l)	Volumen ispitivane kemikalije (ml)		Reagensi i mediji (ml)		
	Radna otopina a) 10 g/l stavak 18.	Radna otopina b) 1 g/l stavak 18.	Voda za razrjeđivanje stavak 14.	Inokulum stavak 16.	Supstrat stavak 17.
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Ukupna zapremnina boce = 160 ml Volumen tekućine = 103 ml
Volumen plina = 57 ml ili 35,6 % ukupnog volumena.

30. Na isti način plinovitim dušikom isperite dovoljno praznih ispitnih boca za eventualne hlapljive i netopljive tekuće ispitne kemikalije (vidjeti stavak 27.).

▼M6

Kontrole i referentna kemikalija

31. Pripreme se serije boca koje obuhvaćaju najmanje tri ponavljanja i sadržavaju samo mulj i supstrat te će služiti kao kontrola. Pripreme se dodatne boce za ponavljanja koje će sadržavati mulj i supstrat plus radnu otopinu referentne kemikalije, 3,5-diklorfenol (stavak 21.), tako da se dobije konačna koncentracija od 150 mg/l. Ta bi koncentracija trebala inhibirati proizvodnju plina za oko 50 %. Druga je mogućnost da se pripremi raspon koncentracija referentne kemikalije. Osim toga, pripreme se četiri dodatne boce za mjerenje pH-vrijednosti, koje sadržavaju mulj, deoksigeniranu vodu i supstrat. Ispitivana se kemikalija doda u dvije boce u najvećoj koncentraciji koja se ispituje, a u preostale dvije boce doda se deoksigenirana voda.

32. Potrebno je osigurati da sve boce – ispitne i referentne kemikalije te kontrole – sadržavaju isti volumen (V_R) tekućine; prema potrebi se dodaje deoksigenirana deionizirana voda (stavak 14.) da se dobije potreban volumen. Plinski prostor mora iznositi između 10 % i 40 % zapremnine boce, pri čemu se stvarna vrijednost odabire na temelju podataka dobivenih preliminarnim ispitivanjem. Nakon što su svi sastojci dodani u boce, uklanja se igla kojom se dovodi plin te se svaka boca začepi gumenim čepom i aluminijskom kapicom (stavak 12. točka (b)), pri čemu se čep navlaži kapljicom deionizirane vode radi lakšeg umetanja. Sadržaj svake boce promiješa se tresenjem.

Inkubiranje boca

33. Boce se prenesu u termostatirani inkubator koji je po mogućnosti opremljen uređajem za tresenje i održavan na temperaturi od 35 °C ± 2 °C. Boce se inkubiraju u tami. Nakon otprilike jednog sata tlak u bocama izjednači se s atmosferskim tlakom uvođenjem injekcijske igle pričvršćene na mjerač tlaka (stavak 12. točka (c)) kroz čep na svakoj boci, otvori se ventil dok mjerač tlaka ne pokaže nulu i na kraju se ventil zatvori. Igla se uvodi pod kutom od oko 45° kako bi se spriječilo istjecanje plina iz boca. Ako se boce inkubiraju bez uređaja za tresenje, tresenje se provodi ručno dva puta dnevno tijekom cijele inkubacije kako bi se sustav uravnotežio. Boce se inkubiraju te se okreću naopako da se spriječi gubitak plina kroz septum. Međutim, okretanje nije primjereno u slučajevima kada netopljive kemikalije mogu prianjati za dno tikvice.

Mjerenje tlaka

34. Kada temperatura boca dosegne 35 °C ± 2 °C, mjeri se i bilježi pH-vrijednost sadržaja dviju od četiri boce pripremljene u tu svrhu te se sadržaj baca; preostale se boce nastavljaju inkubirati u tami. Tlak u bocama mjeri se i bilježi dva puta dnevno tijekom sljedećih 48 do 72 sata uvođenjem igre mjerača tlaka kroz čep svake boce, jedne za drugom, i sušenjem igle između mjerenja. Svi se dijelovi boce drže na temperaturi inkubacije tijekom mjerenja, koje se mora izvesti što je moguće brže. Pričeka se da se očitanje tlaka stabilizira i zatim se bilježi. Potom se otvori ventil za ventilaciju te ponovno zatvori kada vrijednost tlaka dođe na nulu. Test obično traje 48 sati od trenutka prvog izjednačavanja tlaka, koji se označuje kao „vrijeme 0”. Broj očitavanja i ventilacija za hlapljive kemikalije potrebno je ograničiti na jedan (na kraju inkubacije) ili dva, kako bi se gubitak ispitivane kemikalije sveo na najmanju moguću mjeru (10).

35. Ako je očitana vrijednost tlaka negativna, ventil se ne smije otvarati. Ponekad se u injekcijskoj igli i cijevi nakupi vlaga, na što ukazuje mala negativna vrijednost očitanog tlaka. U tom se slučaju igla ukloni, cijev protrese i osuši papirom te se postavi nova igla.

Mjerenje pH-vrijednosti

36. Nakon konačnog mjerenja tlaka izmjeri se i zabilježi pH-vrijednost sadržaja svake boce.

▼M6

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Izražavanje rezultata

37. Izračuna se zbroj i prosjek zabilježenih tlakova u svakom vremenskom intervalu za svaki set boca za ponavljana određivanja te se izračuna srednji kumulativni bruto tlak plina u svakom vremenskom intervalu za svaki set ponavljanja. Prikažu se krivulje srednje kumulativne proizvodnje plina (Pa) u ovisnosti o vremenu za kontrolne, ispitne i referentne boce. Odabere se vrijeme na linearnom dijelu krivulje, obično 48 sati, te se izračuna postotak inhibicije (I) za svaku koncentraciju prema jednadžbi [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

gdje je:

I = postotak inhibicije, u %,

P_t = tlak plina proizveden s ispitnim materijalom u odabranom vremenu, u paskalima (Pa),

P_c = tlak plina proizveden u kontroli u istom vremenu, u paskalima (Pa).

Preporučljivo je izraditi dva grafička prikaza, tj. jedan grafički prikaz u ovisnosti o koncentraciji i drugi u ovisnosti o logaritmu, tako da se može odabrati krivulja koja je bliža linearnosti. Vrijednost EC_{50} (mg/l) određuje se vizualno ili regresijskom analizom iz krivulje koja je bliža linearnosti. U poredbene svrhe ponekad je korisnije izraziti koncentraciju kemikalije kao mg kemikalije / g ukupnih krutih tvari. Da bi se dobila ta koncentracija, volumetrijska koncentracija (mg/l) podijeli se s volumetrijskom koncentracijom suhe tvari u mulju (g/l) (stavak 16.).

38. Izračuna se ili postotak inhibicije postignut jednom koncentracijom upotrijebljene referentne kemikalije ili EC_{50} ako je ispitan dovoljan broj koncentracija.

39. Srednji tlak plina proizvedenog u kontroli P_c (Pa) pretvori se u volumen prema kalibracijskoj krivulji mjerača tlaka (Dodatak 2.) te se iz toga izračuna prinos plina, izražen kao volumen proizveden u 48 sati iz 100 ml nerazrijeđenog mulja pri koncentraciji suhe tvari od 2 % (20 g/l) do 4 % (40 g/l).

Kriteriji valjanosti

40. Rezultati ISO-ovog međulaboratorijskog pokusa (5) pokazali su da referentna kemikalija (3,5-diklorfenol) izaziva 50-postotnu inhibiciju proizvodnje plina pri koncentracijama u rasponu od 32 mg/l do 510 mg/l, sa srednjom vrijednošću od 153 mg/l (stavak 10.). Taj je raspon toliko širok da nije moguće pouzdano utvrditi čvrste granice inhibicije koje bi mogle služiti kao kriteriji valjanosti; to će biti moguće tek kada se razviju tehnike proizvodnje konzistentnijih inokuluma. Volumeni plina proizvedenog u kontrolnim bocama u 48 sati kretali su se u rasponu od 21 ml/g suhe tvari mulja do 149 ml/g (srednja vrijednost 72 ml/g). Nije bilo očite povezanosti između volumena proizvedenog plina i odgovarajuće vrijednosti EC_{50}. Konačna pH-vrijednost kretala se između 6,1 i 7,5.

41. Ispitivanje se smatra valjanim ako se u referentnoj kontroli koja sadržava 150 mg/l 3,5-diklorfenola dobije inhibicija veća od 20 %, ako se u slijepoj probi proizvede više od 50 ml plina po gramu suhe tvari i ako je pH-vrijednost unutar raspona od 6,2 do 7,5 na kraju ispitivanja.

Izvješće o ispitivanju

42. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati slijedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

▼M6

— čistoća (nečistoće) ispitivane kemikalije.

Uvjeti ispitivanja

— volumen tekućeg sadržaja i volumen plinskog prostora u ispitnim posudama,

— opis ispitnih posuda i opreme za mjerenje plina (npr. vrsta mjerača tlaka),

— primjena ispitivane kemikalije i referentne kemikalije na sustav ispitivanja, upotrijebljene ispitne koncentracije i uporaba otapala,

— podaci o upotrijebljenom inokulumu: naziv postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, opis izvora pročišćavanih otpadnih voda (npr. radna temperatura, vrijeme zadržavanja mulja, pretežno komunalne otpadne vode ili industrijski otpad itd.), koncentracija krutih tvari, aktivnost proizvodnje plina anaerobnog digestora, prethodna izloženost ili moguća prethodna prilagodba toksičnim kemikalijama ili mjesto prikupljanja blata, sedimenta itd.,

— temperatura inkubacije i raspon,

— broj ponavljanja.

Rezultati

— pH-vrijednosti na kraju ispitivanja,

— sve vrijednosti izmjerene u ispitnim posudama, slijepim probama i kontrolnim posudama koje sadržavaju referentnu kemikaliju, ovisno o slučaju (npr. tlak u Pa ili milibarima) u obliku tablice,

— postotak inhibicije u ispitnim i referentnim bocama te krivulje koje prikazuju inhibiciju u ovisnosti o koncentraciji,

— izračun vrijednosti EC_{50}, izraženih u mg/l i mg/g,

— proizvodnja plina po gramu mulja u 48 sati,

— obrazloženje odbijanja rezultata ispitivanja,

— rasprava o rezultatima, uključujući sva odstupanja od postupaka navedenih u ovoj ispitnoj metodi, te rasprava o svim odstupanjima rezultata ispitivanja od očekivanih rezultata, a do kojih je došlo zbog interferencija i pogrešaka,

— objašnjenje je li svrha ispitivanja bila izmjeriti toksičnost za mikroorganizme koji su bili prethodno izloženi ili za one koji nisu bili prethodno izloženi.

LITERATURA

(1) Poglavlje C.11 ovog Priloga: Aktivni mulj, test inhibicije disanja (oksidacija ugljika i amonijaka)

(2) Poglavlje C.43 ovog Priloga: Anaerobna biorazgradivost organskih spojeva u razgrađenom mulju: mjerenjem proizvodnje plina.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000.) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans, M. R., Painter, H. A. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick, J. D., Foulkes, M. (1971.) Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58 – 70.

(7) HMSO (1986.) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, u: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984.) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby, N. S. i Wilson, V (1988.) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441 – 2460.

(10) Wilson, V., Painter, H. A. i Battersby, N. S. (1992.) A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Njemačka (1990.) Ur. Steinberg, C. i Kettrup, A., str. 117. – 132. (1992.)

(11) Kawahara, K., Yakabe, Y., Chida, T. i Kida, K. (1999.) Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007 – 2018.

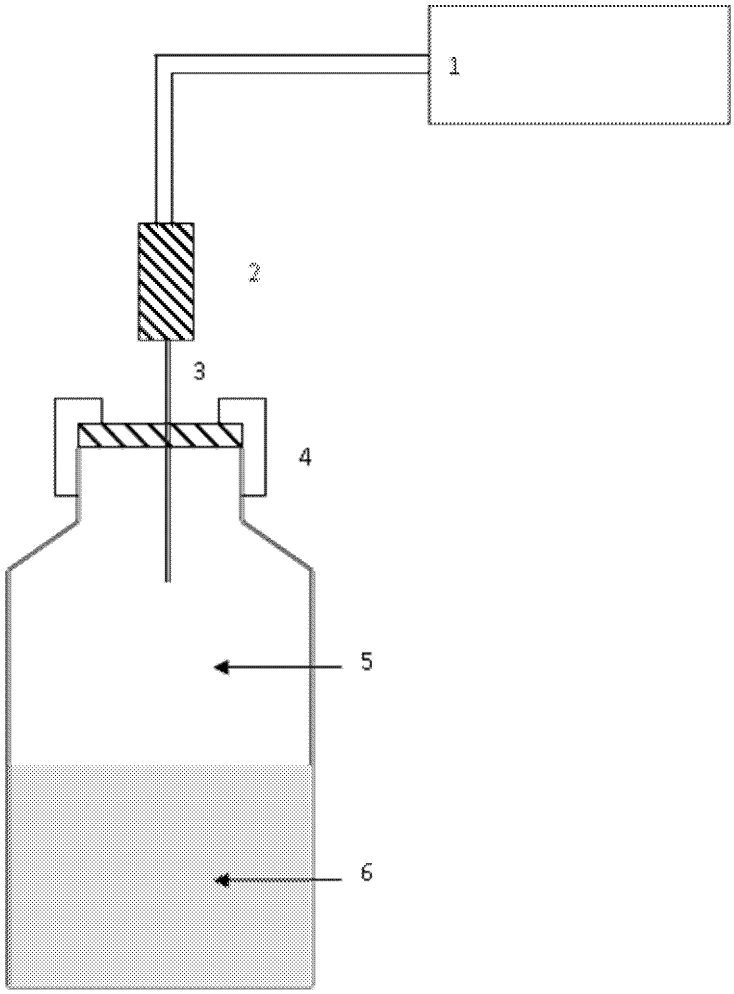
(12) International Organization for Standardization (1995.) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997.) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatak 1.

Primjer aparature za mjerenje proizvodnje bioplina na temelju tlaka plina



Legenda:

1 – mjerač tlaka

2 – trokraki plinonepropusni ventil

3 – injekcijska igla

4 – plinonepropusna brtva (kapica na navoj i septum)

5 – plinski prostor

6 – inokulum od razgrađenog mulja

Ispitne posude održavane na temperaturi od 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatak 2.

Konverzija vrijednosti izmjerenih mjeračem tlaka

Vrijednosti očitane mjeračem tlaka mogu se dovesti u vezu s volumenima plina s pomoću standardne krivulje iz koje se može izračunati volumen plina proizveden po gramu suhog mulja po razdoblju od 48 sati. Indeks aktivnosti primjenjuje se kao jedan od kriterija za procjenu valjanosti ispitnih rezultata. Kalibracijska se krivulja dobije ubrizgavanjem poznatih volumena plina na 35 °C ± 2 °C u serum-boce koje sadržavaju volumen vode jednak onome u reakcijskoj smjesi, V_R.

— Alikvote od V_R ml vode, održavane na 35 °C ± 2 °C, potrebno je uliti u pet serum-boca. Zabrtvite boce i stavite ih u vodenu kupelj na 35 °C ± 2 °C te ih ostavite u njoj jedan sat da se uravnoteže.

— Uključite mjerač tlaka, pričekajte da se stabilizira te ga postavite na nulu.

— Kroz brtvu jedne od boca uvedite injekcijsku iglu, otvorite ventil sve dok mjerač tlaka ne pokaže nulu i potom ga zatvorite.

— Postupak ponovite s preostalim bocama.

— U svaku bocu ubrizgajte1 ml zraka pri 35 °C ± 2 °C. Uvedite iglu (pričvršćenu na mjerač) kroz brtvu jedne od boca i pričekajte da se očitanje tlaka stabilizira. Zabilježite tlak, otvorite ventil dok tlak ne dođe na nulu i zatim zatvorite ventil.

— Postupak ponovite s preostalim bocama.

— Cijeli postupak ponavljajte primjenjujući volumen zraka od 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml.

— Iscrtajte krivulju konverzije koja prikazuje tlak (Pa) u ovisnosti o volumenu ubrizganog plina (ml). Odgovor instrumenta linearan je u rasponu od 0 Pa do 70 000 Pa te od 0 ml do 50 ml proizvedenog plina.

▼M6

Dodatak 3.

Faktori za koje je utvrđeno da mogu dovesti do pogrešnih rezultata

(a) *Kvaliteta čepova na bocama*

Na tržištu su dostupne različite vrste septuma za serum-boce; mnogi od njih, uključujući one od butilnog kaučuka, gube nepropusnost kad se probuše iglom u uvjetima ispitivanja. Ponekad se dogodi da tlak pada vrlo sporo nakon što se septum probuši injekcijskom iglom. Kako bi se izbjegla curenja, preporučuje se uporaba plinonepropusnih septuma (stavak 12. točka (b)).

(b) *Vlaga u injekcijskoj igli*

Ponekad se u injekcijskoj igli i cijevi nakupi vlaga, na što ukazuje mala negativna vrijednost očitanog tlaka. Da biste to ispravili, uklonite iglu, protresite cijev i osušite je papirom te postavite novu iglu.

(c) *Kontaminacija kisikom*

Kod anaerobnih metoda može doći do pogreške zbog kontaminacije kisikom, što može uzrokovati manju proizvodnju plina. U ovoj je metodi tu mogućnost potrebno svesti na najmanju moguću mjeru uporabom strogo anaerobnih tehnika, uključujući uporabu komore za rukovanje s pomoću rukavica.

(d) *Grubi supstrati u mulju*

Na anaerobnu proizvodnju plina i osjetljivost mulja utječu supstrati koji se zajedno s inokulumom prenesu u ispitne boce. Razgrađeni mulj iz domaćih anaerobnih digestora često još uvijek sadržava prepoznatljive tvari poput dlaka i celuloznih ostataka bilja, koji mogu otežati uzimanje reprezentativnih uzoraka. Grube netopljive tvari mogu se ukloniti iz mulja prosijavanjem, čime se povećava vjerojatnost da će uzeti uzorak biti reprezentativan (stavak 16.).

(e) *Hlapljive ispitivane kemikalije*

Hlapljive ispitivane kemikalije oslobađaju se u plinski prostor ispitnih boca. To može dovesti do njihova djelomičnog gubitka iz sustava tijekom ventilacije nakon mjerenja tlaka, što može dati pogrešno visoke vrijednosti EC_{50}. Ta se pogreška može smanjiti tako da se odabere odgovarajući omjer volumena plinskog prostora i volumena tekućine te da se ne provodi ventilacija nakon mjerenja tlaka (10).

(f) *Nelinearnost proizvodnje plina*

Ako grafički prikaz srednje kumulativne proizvodnje plina u ovisnosti o trajanju inkubacije nije približno linearan tijekom razdoblja od 48 sati, točnost ispitivanja može biti smanjena. Da bi se to nadvladalo, preporučljivo je uzeti mulj koji se razgrađuje iz drugog izvora i/ili dodati povećanu koncentraciju ispitnog supstrata – hranjivog bujona, ekstrakta kvasca i glukoze (stavak 29.).

▼M6

Dodatak 4.

Primjena na uzorke iz okoliša s niskom koncentracijom biomase – anaerobno blato, sedimente itd.

UVOD

A.1 Specifična mikrobna aktivnost (volumen plina proizvedenog po gramu suhe tvari) anaerobnih prirodnih blata, sedimenata, tala itd. općenito je mnogo slabija od one kod anaerobnog mulja dobivenog iz otpadnih voda. Stoga je potrebno izmijeniti neke od uvjeta pokusa kada je potrebno izmjeriti inhibitorne učinke kemikalija na te manje aktivne uzorke. Za te manje aktivne uzorke moguća su dva opća postupka:

(a) provesti modificirano preliminarno ispitivanje (stavak 25.) s nerazrijeđenim uzorkom blata, tla itd. pri temperaturi od 35 °C ± 2 °C ili pri temperaturi mjesta uzimanja uzorka, radi točnije simulacije (kao u dijelu 1. norme ISO 13 641);

(b) ili provesti ispitivanje s razrijeđenim (1 u 100) digestorskim muljem kako bi se simulirala niska aktivnost koja se očekuje od uzorka iz okoliša, ali uz održavanje temperature od 35 °C ± 2 °C (kao u dijelu 2. norme ISO 13 641).

A.2. Opcija (a) može se provesti u skladu s ovdje opisanom metodom (koja odgovara dijelu 1. norme ISO 13 641), ali je ključno provesti preliminarno ispitivanje (stavak 25.) kako bi se utvrdili optimalni uvjeti, osim ako su ti uvjeti poznati iz prijašnjih ispitivanja. Uzorak blata ili sedimenta potrebno je temeljito promiješati, npr. u miješalici, te ga po potrebi razrijediti malom količinom odzračene vode za razrjeđivanje (stavak 14.) tako da bude dovoljno fluidan da ga se može prenijeti pipetom s velikim nastavkom ili s pomoću mjernog cilindra. Ako se smatra da nedostaje nutrijenata, uzorak blata može se centrifugirati (u anaerobnim uvjetima) te ponovno suspendirati u mineralnom mediju koji sadržava ekstrakt kvasca (A.11.).

A.3. Opcija (b). Ovom se opcijom primjereno simulira niska aktivnost uzoraka iz okoliša, osim što nema visoke koncentracije suspendiranih krutih tvari koje su prisutne u tim uzrocima. Nije poznato koja je uloga tih tvari u inhibiciji, ali moguće je da bi reakcija između ispitivanih kemikalija i sastojaka blata te adsorpcija ispitivanih kemikalija na krute tvari mogli imati za posljedicu snižavanje toksičnosti ispitivane kemikalije.

A.4. Temperatura je drugi važan faktor: za strogu simulaciju ispitivanja je potrebno provoditi na temperaturi mjesta uzimanja uzorka, jer je poznato da različite skupine konzorcija metanogenih bakterija djeluju unutar različitih raspona temperatura, i to termofili (~ 30 – 35 °C), mezofili (20 – 25 °C) i psihrofili (< 20 °C), koji mogu pokazivati različite inhibitorne obrasce.

A.5. Trajanje. U općem ispitivanju, dio 1., s nerazrijeđenim muljem, uvijek je bilo proizvedeno dovoljno plina u razdoblju od dva do četiri dana, dok je u dijelu 2., s muljem razrijeđenim 100 puta, u tom razdoblju bilo proizvedeno nedovoljno plina u prstenastom ispitivanju. Opisujući tu drugu vrstu ispitivanja, Madsen i sur. (1996.) navode da je potrebno pričekati najmanje sedam dana.

Ispitivanje s niskom koncentracijom biomase (Opcija (b))

Potrebno je izvršiti sljedeće izmjene kojima se dopunjuju ili zamjenjuju neki od postojećih stavaka i podstavaka glavnog teksta.

▼**M6**

A.6. Stavku 6. dodaje se: Načelo ispitivanja;

„Ova se tehnika može primijeniti s anaerobnim muljem razrijeđenim 1: 100 kako bi se djelomično simulirala niska aktivnost blata i sedimenata. Temperatura inkubacije može biti 35 °C ili to može biti temperatura mjesta uzimanja uzorka. Budući da je aktivnost bakterija mnogo manja nego u nerazrijeđenom mulju, razdoblje inkubacije potrebno je produljiti na najmanje sedam dana.”

A.7. Stavku 12. točki (a) dodaje se:

„inkubator mora moći raditi na nižim temperaturama sve do 15 °C.”

A.8. Iza stavka 13. dodaje se dodatni reagens:

„Fosforna kiselina (H_3PO_4), 85 % masenog udjela u vodi.”

A.9. Na kraju stavka 16. dodaje se:

„U ispitivanju se upotrebljava konačna koncentracija od 0,20 ± 0,05 g/l ukupne suhe tvari.”

A.10. Stavak 17. Ispitni supstrat

Ovaj se supstrat ne upotrebljava, nego se zamjenjuje ekstraktom kvasca (vidjeti stavke 17., A.11., A.12. i A.13.).

A.11. Anaerobni mulj mora se razrijediti mineralnim medijem koji sadržava i elemente u tragovima, a iz praktičnih razloga tom se mediju dodaje organski supstrat, ekstrakt kvasca.

Nakon stavka 17. dodaje se:

„(a) Ispitni mineralni medij, s ekstraktom kvasca.

Priprema se od deseterostruko koncentriranog ispitnog medija (stavak 17. točka (b); A.12.) s otopinom elemenata u tragovima (stavak 17. točka (c); A.13.). Upotrebljava se svježe pripremljeni natrij-sulfid-nonahidrat (stavak 17. točka (b); A.12.) ili se opere i osuši prije uporabe kako bi se osiguralo da ima dostatnu redukcijsku sposobnost. Ako se ispitivanje provodi bez uporabe komore za rukovanje s pomoću rukavica (stavak 12. točka (j)), koncentraciju natrijeva sulfida u radnoj otopini potrebno je povećati na 2 g/l (s 1 g/l). Natrijev sulfid može se dodati i iz odgovarajuće radne otopine kroz septum zatvorenih ispitnih boca, čime se smanjuje opasnost od oksidacije, da se dobije konačna koncentracija od 0,2 g/l. Druga je mogućnost uporaba titan(III)-citrata (stavak 17. točka (b)). Doda se kroz septum zatvorenih ispitnih boca da se dobije koncentracija od 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l. Titan(III)-citrat vrlo je djelotvorno redukcijsko sredstvo niske toksičnosti, a priprema se na sljedeći način: Otopi se 2,94 g trinatrijeva citrat dihidrata u 50 ml vode za razrjeđivanje bez kisika (stavak 14.) (čime se dobiva otopina od 200 mmol/l) te se doda 5 ml otopine titan(III)-klorida (15 g na 100 ml vode za razrjeđivanje). Neutralizira se na pH 7 ± 0,5 natrijevim karbonatom i ulije u odgovarajuću serum-bocu pod strujom plinovitog dušika. Koncentracija titan(III)-citrata u ovoj radnoj otopini iznosi 164 mmol/l. Ispitni se medij upotrijebi odmah ili se pohrani na 4 °C najdulje jedan dan.

A.12. (b) Deseterostruko koncentrirani ispitni medij pripremljen od sljedećih sastojaka:

bezvodni kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ili 11,2 g dodekahidrata)	5,3 g
amonijev klorid (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
željezov (II) klorid tetrahidrat ($FeSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (redoks indikator)	0,01 g
natrijev sulfid nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(ili titan(III)-citrat) konačna koncentracija	0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l
otopina elemenata u tragovima (vidjeti stavak 17. točku (c); A.13.)	10,0 ml
ekstrakt kvasca	100 g
Otopiti u vodi za razrjeđivanje (stavak 14.) i nadopuniti do:	1 000 ml

A.13. (c) Otopina elemenata u tragovima pripremljena od sljedećih sastojaka:

magnezijev(II) klorid tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborna kiselina (H_3BO_3)	0,05 g
cinkov klorid ($ZnCl_2$)	0,05 g
bakrov(II) klorid ($CuCl_2$)	0,03 g
natrijev molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobaltov(II) klorid heksahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
niklov(II) klorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatrijev selenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Otopiti u vodi za razrjeđivanje (stavak 14.) i nadopuniti do:	1 000 ml”

A.14. Stavak 25.: Preliminarno ispitivanje

Ključno je provesti preliminarno ispitivanje onako kako je opisano u stavku 24., osim što koncentracije krute tvari mulja moraju biti jednake stotom dijelu navedenih vrijednosti, to jest iznositi 0,1 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l. Inkubacija mora trajati najmanje sedam dana.

Napomena: u prstenastom ispitivanju (5) volumen plinskog prostora bio je prevelik i iznosio je 75 % ukupnog volumena; mora biti u preporučenom rasponu od 10 % do 40 %. Relevantan je kriterij taj da se volumen plina proizvedenog pri inhibiciji od oko 80 % mora moći izmjeriti s prihvatljivom preciznošću (npr. od ± 5 % do ± 10 %).

A.15. Stavci 26. do 30.: Dodavanje ispitivane kemikalije, inokuluma i supstrata.

Dodavanja se provode na isti način kao što je opisano u tim stavcima, s tim da se otopina supstrata (stavak 17.) zamijeni ispitnim medijem kojemu je dodan ekstrakt kvasca (A.11.).

Isto tako, konačna koncentracija suhe tvari u mulju smanji se s 2 g/l do 4 g/l na 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). U tablici A.1., koja zamjenjuje tablicu u stavku 29., navedena su dva primjera dodavanja sastojaka u ispitnu smjesu.

A.16. Stavak 33.: Inkubiranje boca

Zbog očekivane manje brzine proizvodnje plina, inkubacija traje najmanje sedam dana.

▼**M6**

A.17. Stavak 34.: Mjerenja tlaka

Ako je potrebno izmjeriti količine u plinovitoj fazi, primjenjuje se isti postupak mjerenja tlaka u plinskom prostoru boca koji je opisan u stavku 34. Ako se mjere ukupne količine CO_2 plus CH_4, pH-vrijednost tekuće faze smanji se na pH-vrijednost oko 2 ubrizgavanjem H_3PO_4 u svaku relevantnu bocu i mjerenjem tlaka nakon protresanja u trajanju od 30 minuta na temperaturi ispitivanja. Međutim, više se informacija o kvaliteti inokuluma može dobiti mjerenjem tlaka u svakoj boci prije i nakon zakiseljavanja. Primjerice, ako je brzina proizvodnje CO_2 mnogo veća od brzine proizvodnje metana, možda je promijenjena osjetljivost fermentativnih bakterija i/ili ispitivana kemikalija u prvom redu utječe na metanogene bakterije.

A.18. Stavak 36.: mjerenje pH-vrijednosti

Ako će se upotrebljavati H_3PO_4, mora se pripremiti nekoliko dodatnih boca bez dodanog H_3PO_4, koje će biti posebno namijenjene za mjerenje pH-vrijednosti.

IZVOR:

Madsen, T, Rasmussen, H. B. i Nilsson, L (1996.) Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No. 336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tablica A.1.

Primjeri plana ispitivanja za ispitne serije

Sastojci reakcijske smjese	Primjer 1.	Primjer 2.	Uobičajeni redoslijed dodavanja
Koncentracija pripremljenog inokuluma (g/l)	0,42	2,1	—
Volumen dodanog inokuluma (ml)	45	9	4
Koncentracija inokuluma u ispitnim bocama (g/l)	0,20	0,20	—
Volumen dodanog ispitnog medija (ml)	9	9	2
Volumen dodane vode za razrjeđivanje (ml)	36	72	3
Koncentracija ekstrakta kvasca u ispitnim bocama (g/l)	9,7	9,7	—
Volumen radne otopine ispitivane kemikalije (ml)	3	3	1
Ukupan volumen tekućine (ml)	93	93	—

▼**M6**

Dodatak 5.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije:

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Ispitivana kemikalija znači svaka tvari ili smjesa koja se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M6

C.35. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA *LUMBRICULUS* U SUSTAVU SEDIMENT-VODA UPORABOM SEDIMENTA OBRAĐENOG SPIKINGOM

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 225 (2007.). Endobentičke životinje koji se hrane sedimentom u opasnosti su od potencijalno visoke izloženosti kemikalijama povezanima sa sedimentom te im je stoga potrebno posvetiti posebnu pozornost, npr. (1), (2), (3). Među tim organizmima koji se hrane sedimentom vodeni oligoheti igraju važnu ulogu u sedimentima vodenih sustava. Bioturbacijom tla te stoga što služe kao plijen, te životinje mogu snažno utjecati na bioraspoloživost kemikalija drugim organizmima, npr. bentivornim ribama. Za razliku od epibentičkih organizama, endobentički vodeni oligoheti (npr. *Lumbriculus variegatus*) ruju po sedimentu i hrane se česticama ispod površine sedimenta. Tako je osigurana izloženost ispitnih organizama ispitivanoj kemikaliji svim mogućim putovima (npr. dodirom s kontaminiranim česticama sedimenta ili gutanjem takvih čestica, ali i putem porne vode i vode iznad sedimenta).

2. Ova je ispitna metoda namijenjena procjeni učinaka produljenog izlaganja endobentičkog oligoheta *Lumbriculus variegatus* (Müller) kemikalijama povezanima sa sedimentom. Temelji se na postojećim protokolima za ispitivanje toksičnosti sedimenta i bioakumulacije, npr. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoda je opisana za uvjete statičkog ispitivanja. Scenarij izlaganja koji se primjenjuje u ovoj ispitnoj metodi jest obogaćivanje sedimenta ispitivanom kemikalijom postupkom spikinga. Cilj uporabe sedimenta obrađenog spikingom jest simulirati sediment kontaminiran ispitivanom kemikalijom.

3. Kemikalije koje je potrebno ispitati na organizmima koji žive u sedimentu obično opstaju u sedimentu tijekom duljih razdoblja. Organizmi iz sedimenta mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno da bi svaki od tih načina pridonio općim učincima toksičnosti ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima predmetne kemikalije i njezinoj konačnoj sudbini u životinji. Za vrlo adsorptivne kemikalije (npr. s log K_{ow} > 5) ili za kemikalije koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama značajan način izlaganja može biti gutanje kontaminirane hrane. Kako se ne bi podcijenila toksičnost takvih kemikalija, hrana potrebna za razmnožavanje i rast ispitnih organizama dodaje se sedimentu prije primjene ispitivane kemikalije (11). Ova ispitna metoda pruža dovoljno detalja za provedbu ispitivanja, ali istodobno ostavlja dovoljno slobode za prilagođavanje plana pokusa ovisno o uvjetima u pojedinim laboratorijima i različitim svojstvima ispitivanih kemikalija.

4. Cilj je ispitne metode utvrditi učinke ispitivane kemikalije na razmnožavanje i biomasu ispitnih organizama. Mjereni su biološki parametri ukupan broj preživjelih crva i biomasa (suha masa) na kraju izlaganja. Ti se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize s ciljem određivanja koncentracije koja bi izazvala učinak od x % (npr. EC_{50}, EC_{25} i EC_{10}) bilo testiranjem statističke hipoteze s ciljem određivanja najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) i najniže koncentracije s vidljivim učinkom (LOEC).

5. U poglavlju C.27. ovog Priloga, „Test toksičnosti trzalaca (*Chironomidae*) u vodi iz sedimenta sa sedimentom obrađenim spikingom” (6), navedeni su brojni ključni i korisni podaci za provedbu prikazane metode ispitivanja toksičnosti sedimenta. Stoga je taj dokument poslužio kao osnova za izradu izmjena potrebnih za ispitivanje toksičnosti sedimenta s *Lumbriculus variegatus*. Ostali su dokumenti na koje se upućuje npr. ASTM Standard

▼M6

Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (ASTM-ov standardni vodič za određivanje bioakumulacije kontaminanata povezanih sa sedimentom u bentičkim beskralježnjacima) (3), U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (U.S. EPA-ine metode za mjerenje toksičnosti i bioakumulacije kontaminanata povezanih sa sedimentom na slatkovodnim beskralježnjacima) (7) i ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (ASTM-ov standardni vodič za prikupljanje, skladištenje, karakterizaciju i rukovanje sedimentima za toksikološka ispitivanja i za odabir naprava za uzorkovanje bentičkih beskralježnjaka (12). Osim toga, praktično iskustvo stečeno tijekom prstenastog ispitivanja ispitne metode ((13), izvješće o prstenastom ispitivanju) i podaci iz literature glavni su izvori informacija za sastavljanje ovog dokumenta.

OBVEZATNI I PREPORUČLJIVI PODACI

6. Prije početka istraživanja potrebno je dobiti podatke o ispitivanoj kemikaliji, kao što su mjere opreza, ispravni uvjeti skladištenja i analitičke metode. Smjernice za ispitivanje kemikalija čija su fizikalno-kemijska svojstva takva da je zbog njih teško provesti ispitivanje nalaze se u literaturi pod točkom (14).

7. Prije ispitivanja moraju biti poznate sljedeće informacije o ispitivanoj kemikaliji:

   — uobičajeni naziv, kemijski naziv (po mogućnosti IUPAC-ov naziv), strukturna formula, CAS-ov registarski broj, čistoća,

   — tlak pare,

   — topljivost u vodi.

8. Smatra se korisnim znati sljedeće dodatne podatke prije početka ispitivanja:

   — koeficijent razdjeljenja između oktanola i vode, K_{ow},

   — koeficijent razdjeljenja između organskog ugljika i vode, izražen kao K_{oc},

   — hidroliza,

   — fototransformacija u vodi;

   — biorazgradivost,

   — površinska napetost.

9. Prije početka ispitivanja potrebno je dobiti podatke o određenim svojstvima sedimenta koji će biti upotrijebljen (7). Za detalje vidjeti stavke od 22. do 25.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Crvi sličnog fiziološkog stanja (sinkronizirani kako je opisano u Dodatku 5.) izlažu se nizu koncentracija toksičnih tvari primijenjenih na sedimentnu fazu sustava sediment-voda. Kao medij potrebno je upotrijebiti umjetni sediment i obrađenu vodu. Ispitne posude u koje nije dodana ispitivana kemikalija služe kao kontrola. Ispitivana kemikalija doda se u sediment postupkom spikinga u velikoj količini za svaku razinu koncentracije kako bi se smanjila varijabilnost među ponavljanjima te se potom ispitni organizmi unesu u ispitne posude u kojima su se uravnotežile koncentracije sedimenta i vode (vidjeti stavak 29.). Ispitne životinje izlažu se sustavu sediment-voda 28 dana. S obzirom na to da umjetni sediment sadržava male količine hranjivih tvari, potrebno ga je obogatiti nekim izvorom hrane (vidjeti stavke 22. do 23. i Dodatak 4.) kako bi se osiguralo da crvi rastu i razmnožavaju se u kontroliranim uvjetima. Na taj se način osigurava izlaganje ispitnih životinja preko vode i sedimenta, kao i preko hrane.

11. Preferirana krajnja točka ove vrste istraživanja jest EC_x (npr. EC_{50}, EC_{25} i EC_{10}; koncentracija s učinkom na x % ispitnih organizama) za razmnožavanje i biomasu u usporedbi s kontrolom. Međutim, potrebno je napomenuti da se s obzirom na visoku nesigurnost koja obilježava EC_x niskih vrijednosti

▼M6

(npr. EC_{10}, EC_{25}) s izuzetno visokim granicama pouzdanosti od 95 % (npr. (15)) te statističku snagu izračunanu tijekom testiranja hipoteze smatra da je EC_{50} najpouzdanija krajnja točka. Osim toga, za biomasu i razmnožavanje mogu se izračunati najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC), pod uvjetom da plan ispitivanja i podaci podržavaju te izračune (vidjeti stavke od 34. do 38.). Svrha istraživanja, EC_x ili izračun NOEC-a određuju plan ispitivanja.

REFERENTNO ISPITIVANJE

12. Očekuje se da će rezultati dobiveni s kontrolnim organizmima u dovoljnoj mjeri pokazati je li laboratorij sposoban provoditi ispitivanje te, ako su na raspolaganju podaci iz prijašnjih ispitivanja, je li ispitivanje ponovljivo. Osim toga, referentni testovi toksičnosti mogu se provoditi u redovitim vremenskim razmacima primjenom referentne toksične tvari kako bi se procijenila osjetljivost ispitnih organizama. Referentni testovi toksičnosti u vodi u trajanju od 96 sati mogu na zadovoljavajući način pokazati osjetljivost i stanje ispitnih životinja (4) (7). Informacije o toksičnosti pentaklorfenola (PCP) u potpunim testovima (28 dana izloženosti sedimentu obrađenom spikingom) navedeni su u Dodatku 6. i u izvješću o prstenastom ispitivanju ispitne metode (13). Akutna toksičnost PCP-a samo u vodi opisana je npr. u (16). Ti se podaci mogu upotrijebiti za usporedbu osjetljivosti ispitnog organizma u referentnim testovima s PCP-om kao referentnom toksičnom tvari. Kalijev klorid (KCl) ili bakrov sulfat ($CuSO_4$) preporučeni su kao referentne toksične tvari za *L. variegatus* (4) (7). Za sada je teško utvrditi kriterije kvalitete na temelju podataka o toksičnosti za KCl zbog nedostatka podataka iz literature za *L. variegatus*. Informacije o toksičnosti bakra za *L. variegatus* mogu se pronaći u literaturi pod (17) do (21).

VALJANOST ISPITIVANJA

13. Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju biti ispunjeni sljedeći zahtjevi:

— Prstenastim ispitivanjem (13) pokazano je da, kad je riječ o *Lumbriculus variegatus*, prosječan broj živih crva po ponavljanju u kontrolama mora biti veći najmanje za faktor 1,8 na kraju izlaganja u usporedbi s brojem crva po ponavljanju na početku izlaganja.

— pH-vrijednost vode iznad sedimenta mora biti između 6 i 9 tijekom cijelog ispitivanja.

— Tijekom ispitivanja koncentracija kisika u vodi iznad sedimenta ne smije biti manja od 30 % vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV) na ispitnoj temperaturi.

OPIS ISPITNE METODE

Sustav ispitivanja

14. Preporučuju se statički sustavi bez obnavljanja vode iznad sedimenta. Ako je omjer sedimenta i vode (vidjeti stavak 15.) primjeren, za održavanje kvalitete vode na razinama koje su prihvatljive za ispitne organizme obično je dovoljno blago dozračivanje (npr. postizanje maksimalnih razina otopljenog kisika i minimalnog nakupljanja proizvoda izlučivanja). Polustatični ili protočni sustavi sa stalnim ili isprekidanim obnavljanjem vode iznad sedimenta mogu se primijeniti samo u iznimnim slučajevima, jer se očekuje da će redovito obnavljanje vode iznad sedimenta utjecati na kemijsku ravnotežu (npr. gubitak ispitivane kemikalije iz ispitnog sustava).

Ispitne posude i aparatura

15. Izlaganje je potrebno provoditi u staklenim laboratorijskim čašama od npr. 250 ml i promjera 6 cm. Mogu se upotrijebiti i druge prikladne staklene posude, ali se mora zajamčiti da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. U svaku posudu potrebno je staviti sloj od oko 1,5 do

▼M6

3 cm formuliranog sedimenta. Omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta mora biti 1: 4. Posude moraju biti prikladne zapremnine u skladu s brzinom punjenja, tj. brojem ispitnih crva dodanih po jedinici mase sedimenta (vidjeti i stavak 39.).

16. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u dodir s ispitnom kemikalijom moraju biti u cijelosti izrađeni od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Potrebno je obratiti posebnu pažnju na to da se za sve dijelove opreme izbjegava uporaba materijala koji se mogu otapati, adsorbirati ispitivanu kemikaliju ili propuštati druge kemikalije te imati negativan učinak na ispitne životinje. Za svu opremu koja dolazi u doticaj s ispitnim medijem potrebno je upotrebljavati politetrafluoretilen (PTFE), plemeniti čelik i/ili staklo. Za organske kemikalije za koje je poznato da adsorbiraju na staklo možda će biti potrebno silanizirano staklo. U tom se slučaju oprema mora baciti nakon uporabe.

Ispitne vrste

17. Ispitna vrsta koja se upotrebljava u ovoj vrsti istraživanja jest slatkovodni oligohet *Lumbriculus variegatus* (Müller). Ta vrsta podnosi široku lepezu tipova sedimenata i naširoko se upotrebljava za ispitivanje toksičnosti i bioakumulacije u sedimentima [npr. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Potrebno je izvijestiti o podrijetlu ispitnih životinja, potvrđivanju identifikacije vrste (npr. (36)) i uvjetima uzgoja. Identifikacija vrste nije potrebna prije svakog ispitivanja ako organizmi potječu iz kulture uzgojene u laboratoriju.

Uzgoj kulture ispitnih organizama

18. Kako bi se osigurao dovoljan broj crva za ispitivanje toksičnosti sedimenta, korisno je držati crve u trajnoj laboratorijskoj kulturi. Smjernice o metodama uzgoja laboratorijskih kultura za *Lumbriculus variegatus* te izvori početnih kultura navedeni su u Dodatku 5. Za detalje o uzgoju ove vrste vidjeti literaturu pod (3), (7) i (27).

19. Kako bi se osiguralo da se ispitivanja provode na životinjama iste vrste, izričito se preporučuje uspostavljanje kultura pojedinačnih vrsta. Potrebno je uvjeriti se da kod kultura i posebno kod crva koji se upotrebljavaju u ispitivanjima nema vidljivih bolesti i anomalija.

Voda

20. Preporučuje se da se kao voda iznad sedimenta u ispitivanjima upotrijebi voda obrađena u skladu s poglavljem C.1. ovog Priloga (37); može se upotrijebiti i za laboratorijske kulture crva (za pripremu vidjeti Dodatak 2.). Ako je potrebno, može se upotrijebiti prirodna voda. Odabrana voda mora biti takve kvalitete da omogućuje rast i razmnožavanje ispitne vrste za vrijeme aklimatizacije i razdoblja ispitivanja, a da pritom ne pokazuju nikakve anomalije u izgledu ili ponašanju. Pokazalo se da *Lumbriculus variegatus* preživljava, raste i razmnožava se u toj vrsti vode (30), koja omogućuje maksimalnu standardizaciju uvjeta ispitivanja i uzgoja. Ako se upotrebljava obrađena voda, potrebno je izvijestiti o njezinu sastavu i prije uporabe potrebno joj je utvrditi svojstva, i to barem pH-vrijednost, sadržaj kisika i tvrdoću (izraženu u mg $CaCO_3$ / l). Korisne se informacije mogu dobiti analizom vode na mikroonečišćivače prije uporabe (vidjeti npr. Dodatak 3.).

21. pH-vrijednost vode iznad sedimenta mora biti u rasponu od 6,0 do 9,0 (vidjeti stavak 13.). Ako se očekuje povećani nastanak amonijaka, smatra se korisnim održavati pH-vrijednost između 6,0 i 8,0. Za ispitivanje npr. slabih organskih kiselina preporučljivo je prilagoditi pH-vrijednost puferiranjem vode koja će se upotrebljavati u ispitivanju, kako je opisano npr. u (16). Ukupna tvrdoća vode koja će se upotrebljavati u ispitivanju mora biti između 90 i 300 mg $CaCO_3$ po litri prirodne vode. U Dodatku 3. navedeni su dodatni kriteriji za prihvatljivu vodu za razrjeđivanje u skladu s OECD-ovom Smjernicom br. 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Budući da je moguće da tijekom cijele godine neće biti dostupni nekontaminirani prirodni sedimenti iz određenog izvora te da prirođeni organizmi, kao i prisutnost mikroonečišćivača mogu utjecati na ispitivanje, poželjno je upotrebljavati formulirani sediment. Uporabom formuliranog sedimenta smanjuje se varijabilnost uvjeta ispitivanja i unošenje urođene faune. Slijedeći se formulirani sediment temelji na umjetnom sedimentu prema (6), (39) i (40). U ovoj se vrsti ispitivanja preporučuje za uporabu ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

(a) 4 do 5 % (suhe mase) sphagnum treseta; važno je upotrijebiti trest u obliku praha, „srednjeg" stupnja raspadanja, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 0,5 mm) i sušen isključivo na zraku;

(b) 20 ± 1 % (suhe mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %);

(c) 75 do 76 % (suhe mase) kremenog pijeska (fini pijesak, veličine zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % čestica mora biti veličine između 50 i 200 μm);

(d) deionizirana voda, 30 do 50 % suhe mase sedimenta, uz suhe sastojke sedimenta;

(e) dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kakvoće ($CaCO_3$) kako bi se prilagodila pH-vrijednost konačne smjese sedimenta;

(f) ukupan sadržaj organskog ugljika (TOC) u konačnoj smjesi mora iznositi 2 % (± 0,5 %) suhe mase sedimenta i potrebno ga je prilagoditi dodavanjem odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c);

(g) hrana, npr. lišće velike koprive u prahu (*Urtica sp*., u skladu s farmaceutskim standardima, za prehranu ljudi) ili smjesa lišća *Urtica sp*. u prahu i alfa-celuloze (1: 1), u količini od 0,4 do 0,5 % suhe mase sedimenta, uz suhe sastojke sedimenta; za detalje vidjeti Dodatak 4.

23. Izvor treseta, kaolinitske gline i pijeska mora biti poznat. Osim materijala iz točke (g), u poglavlju C.27. ovog Priloga (6) navedeni su alternativni biljni materijali koji se upotrebljavaju kao izvor hrane: osušeno lišće duda (*Morus alba*), bijele djeteline (*Trifolium repens*), špinata (*Spinacia oleracea*) ili žitne trave.

24. Odabrani izvor hrane potrebno je dodati prije ili tijekom uvođenja ispitivane kemikalije u sediment postupkom spikinga. Odabrani izvor hrane mora omogućiti najmanje prihvatljivo razmnožavanje u kontrolama. Korisne bi se informacije mogle dobiti analizom umjetnog sedimenta ili njegovih sastojaka na mikroonečišćivače prije uporabe. Primjer pripreme formuliranog sedimenta opisan je u Dodatku 4. Miješanje suhih sastojaka također je prihvatljivo ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. lebdenje čestica treseta) i da su treset ili sediment prethodno dovoljno kondicioniran (vidjeti i stavak 25. te Prilog 4.). Za umjetni sediment potrebno je odrediti barem podrijetlo sastojaka, raspodjelu veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), ukupni sadržaj organskog ugljika (TOC), sadržaj vode i pH. Mjerenje redoks potencijala nije obvezatno.

25. Prema potrebi, npr. za posebne ispitne svrhe, prirodni sedimenti s neonečišćenih mjesta mogu poslužiti kao ispitni sediment i/ili sediment za uzgoj kultura. Međutim, ako se upotrebljava prirodni sediment, potrebno mu je odrediti barem podrijetlo (mjesto uzimanja), pH i amonijak u pornoj vodi,

▼M6

ukupan sadržaj organskog ugljika (TOC) i sadržaj dušika, raspodjelu veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline) i postotni sadržaj vode (7) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli natjecati s ispitnim organizmima ili kojima bi ispitni organizmi mogli biti plijen. Mjerenje redoks potencijala i kapaciteta izmjene kationa nije obvezatno. Isto se tako preporučuje da se prirodni sediment, prije nego što se u njega uvede ispitna kemikalija postupkom spikinga, kondicionira sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u sljedećem ispitivanju. Na kraju razdoblja kondicioniranja vodu iznad sedimenta potrebno je ukloniti i baciti.

26. Sediment koji će se upotrebljavati mora biti takve kvalitete da omogućuje preživljavanje i razmnožavanje kontrolnih organizama tijekom razdoblja izloženosti, a da pritom ne pokazuju nikakve anomalije u izgledu ili ponašanju. Kontrolni crvi trebali bi rovati po sedimentu i jesti ga. Razmnožavanje u kontrolama mora biti barem u skladu s kriterijem valjanosti opisanim u stavku 13. Prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta na površini sedimenta, koji ukazuju na to da crvi jedu sediment, potrebno je zabilježiti i ti podaci mogu pomoći pri tumačenju rezultata ispitivanja u pogledu putova izloženosti. Dodatne informacije o hranjenju sedimentom mogu se dobiti primjenom metoda opisanih u (24), (25), (44) i (45), kojima se utvrđuje hranjenje sedimentom ili odabir čestica u ispitnim organizmima.

27. Načini postupanja s prirodnim sedimentima prije njihove uporabe u laboratoriju opisani su u (3), (7) i (12). Priprema i čuvanje umjetnog sedimenta čija se uporaba preporučuje u ispitivanju s *Lumbriculus* opisani su u Dodatku 4.

Primjena ispitivane kemikalije

28. Ispitivanu kemikaliju treba unijeti u sediment spikingom. Budući da se očekuje da većina ispitivanih kemikalija ima slabu topljivost u vodi, potrebno ih je otopiti u odgovarajućem organskom otapalu (npr. acetonu, n-heksanu, cikloheksanu) u što je moguće manjem volumenu kako bi se pripremila radna otopina. Radne otopine potrebno je razrijediti istim otapalom kako bi se pripremile ispitne otopine. Glavni kriteriji za odabir odgovarajućeg otapajućeg sredstva trebali bi biti toksičnost i hlapljivost otapala te topljivost ispitivane kemikalije u odabranom otapalu. Za svaku je razinu koncentracije potrebno upotrijebiti isti volumen odgovarajuće otopine. Ispitivana kemikalija doda se u sediment postupkom spikinga u velikoj količini za svaku razinu koncentracije, kako bi se smanjila varijabilnost koncentracije ispitivane kemikalije među ponavljanjima. Potom se svaka od ispitnih otopina pomiješa s kremenim pijeskom na način opisan u stavku 22. (npr. 10 grama kremenog pijeska po ispitnoj posudi). Pokazalo se da je za potpuno namakanje kremenog pijeska dovoljan volumen od 0,20 do 0,25 ml po gramu pijeska. Otapalo se potom mora ispariti do suha. Kako bi se što je moguće više smanjili gubici ispitivane kemikalije do kojih dolazi zbog suisparavanja (npr. ovisno o tlaku para kemikalije), obloženi se pijesak mora upotrijebiti odmah nakon sušenja. Suhi se pijesak pomiješa s prikladnom količinom formuliranog sedimenta odgovarajuće koncentracije. Pri pripremi sedimenta potrebno je uzeti u obzir količinu pijeska koja se unosi smjesom ispitivane kemikalije i pijeska (tj. sediment je potrebno pripremiti s manje pijeska). Glavna je prednost ovog postupka u tome da se u tlo zapravo ne uvodi nimalo otapala (7). Druga je mogućnost, npr. ako je riječ o prirodnom sedimentu, da se ispitivana kemikalija doda spikingom u osušeni i fino usitnjeni dio sedimenta kako je ranije u tekstu opisano za kremeni pijesak ili da se ispitivana kemikalija pomiješa u vlažno tlo, uz naknadno isparavanje upotrijebljenog otapajućeg sredstva. Treba se pobrinuti da ispitivana tvar koja se dodaje u sediment bude temeljito i ravnomjerno raspoređena u sedimentu. Ako je potrebno, mogu se analizirati poduzorci kako bi se potvrdile ciljane koncentracije u sedimentu te odredio stupanj homogenosti. Isto tako može biti korisno analizirati poduzorke ispitnih otopina kako bi se potvrdile ciljane koncentracije u sedimentu.

▼M6

Budući da se za oblaganje kremenog pijeska ispitnom kemikalijom upotrebljava otapalo, potrebno je upotrijebiti kontrolu s otapalom koja se priprema s istom količinom otapala kao i ispitni sedimenti. Potrebno je izvijestiti o metodi koja se upotrijebila za spiking te o razlozima za odabir specifičnog postupka spikinga koji je drukčiji od opisanog ranije u tekstu. Metoda spikinga može se prilagoditi fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, npr. kako bi se izbjegli gubici zbog ishlapljivanja tijekom spikinga ili uravnoteženja. Dodatne smjernice o postupcima spikinga navedene su u *Environment Canada* (1995.) (46).

29. Nakon što se sediment obradi spikingom, raspodijeli u ispitne posude i pokrije ispitnom vodom, poželjno je dopustiti razdiobu ispitivane tvari iz sedimenta u tekuće stanje (npr. (3) (7) (9)). To bi se po mogućnosti trebalo učiniti u uvjetima temperature i dozračivanja koji se primjenjuju u ispitivanju. Prikladno vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i kemikaliju, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, a u rijetkim slučajevima i do nekoliko tjedana (četiri do pet tjedana) (npr. (27) (47)). U ovom se ispitivanju ne čeka uravnoteženje, ali se preporučuje vrijeme uravnoteženja od 48 sati do sedam dana. Time se smanjuje vrijeme potrebno za razgradnju ispitivane kemikalije. Ovisno o cilju istraživanja, npr. kada je potrebno oponašati uvjete u okolišu, sediment obrađen postupkom spikinga može se ostaviti dulje vrijeme da se uravnotežuje ili „stari”.

30. Na kraju tog razdoblja uravnoteženja potrebno je uzeti barem uzorke vode iznad sedimenta i samog sedimenta, i to barem kod najviše koncentracije i kod jedne niže, kako bi se analizirala koncentracija ispitivane kemikalije Ta analitička određivanja ispitivane kemikalije omogućuju izračun bilance mase i izražavanje rezultata na temelju izmjerenih početnih koncentracija. Općenito, uzorkovanjem se remeti i uništava sustav sediment-voda. Stoga obično nije moguće upotrijebiti ista ponavljanja za uzrokovanje sedimenta i crva. Moraju se postaviti dodatne „analitičke” posude odgovarajućih dimenzija, koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisutnost ispitnih organizama), ali se ne upotrebljavaju za biološka promatranja. Dimenzije posuda moraju biti takve da omoguće uzimanje onih količina uzoraka koje zahtijeva analitička metoda. Uzorkovanje je pobliže opisano u stavku 53.

PROVEDBA ISPITIVANJA

Preliminarno ispitivanje

31. Ako nisu dostupne informacije o toksičnosti ispitivane kemikalije za *Lumbriculus variegatus*, može biti korisno provesti preliminarni pokus kako bi se odredio raspon koncentracija koje je potrebno ispitati u glavnom ispitivanju te kako bi se optimizirali ispitni uvjeti za glavno ispitivanje. U tu se svrhu primjenjuje niz široko razmaknutih koncentracija ispitivane tvari. Crvi se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije u razdoblju (npr. 28 dana kao u glavnom ispitivanju) koje omogućuje procjenu odgovarajuće ispitne koncentracije; ponavljanja nisu potrebna. Tijekom preliminarnog ispitivanja potrebno je promatrati i zabilježiti ponašanje crva, na primjer izbjegavanje sedimenta, koje je možda uzrokovano ispitnom kemikalijom i/ili sedimentom. U preliminarnom ispitivanju ne bi trebalo ispitivati koncentracije veće od 1 000 mg/kg suhe mase sedimenta.

Glavno ispitivanje

32. U glavnom je ispitivanju potrebno upotrijebiti i odabrati najmanje pet koncentracija, npr. na temelju rezultata preliminarnog ispitivanja za određivanje raspona (stavak 31.) i kako je opisano u stavcima 35., 36., 37. i 38.

▼M6

33. Uz ispitni niz provodi se kontrola (za broj ponavljanja vidjeti stavke 36., 37. i 38.) koja sadržava sve sastojke osim ispitivane kemikalije. Ako se za primjenu ispitivane kemikalije upotrebljava otapajuće sredstvo, ono ne smije imati značajan učinak na ispitne organizme, što mora potvrditi kontrola s otapalom bez ispitivane kemikalije.

Plan ispitivanja

34. Plan ispitivanja odnosi se na odabir broja i rasporeda ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju te na broj crva dodanih po posudi. Planovi za procjenu vrijednosti EC_x, za procjenu NOEC-a i za provođenje graničnog ispitivanja opisani su u stavcima 35., 36., 37. i 38.

35. Koncentracija s učinkom (npr. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) i raspon koncentracija u kojemu je učinak ispitivane kemikalije od interesa moraju obuhvaćati koncentracije uključene u ispitivanje. Potrebno je izbjegavati ekstrapolaciju ispod najniže koncentracije koja utječe na ispitne organizme ili iznad najviše ispitane koncentracije. Ako se u iznimnim slučajevima takva ekstrapolacija ipak provodi, u izvješću se mora navesti detaljno obrazloženje.

36. Ako se procjenjuje EC_x, potrebno je ispitati barem pet koncentracija i najmanje tri ponavljanja za svaku koncentraciju; preporučuje se šest ponavljanja za kontrolu ili, ako se upotrebljava, kontrolu samo s otapalom kako bi se poboljšala procjena varijabilnosti među kontrolama. U svakom se slučaju savjetuje uporaba dovoljnog broja ispitnih koncentracija kako bi se dobila dobra procjena modela. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (iznimka se može učiniti u slučajevima kada krivulja odgovora na koncentraciju ima plitak nagib). Broj ponavljanja po svakom tretmanu može se smanjiti ako se poveća broj ispitnih koncentracija s odgovorima u rasponu od 5 do95 %. Povećanje broja ponavljanja ili smanjenje intervala između ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti za ispitivanje.

37. Ako se procjenjuje ECx, potrebno je ispitati barem pet koncentracija i najmanje četiri ponavljanja za svaku koncentraciju (preporučuje se šest ponavljanja za kontrolu ili, ako se upotrebljava, kontrolu samo s otapalom kako bi se poboljšala procjena varijabilnosti među kontrolama), a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva. U Dodatku 6. navedene su neke informacije o statističkoj snazi utvrđenoj tijekom testiranja hipoteze u prstenastom ispitivanju ispitne metode.

38. Može se provesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrole) ako se ne očekuju učinci pri koncentracijama od 1 000 mg/kg suhe mase sedimenta (npr. prema preliminarnom ispitivanju za određivanje raspona) ili ako je ispitivanje sa samo jednom koncentracijom dovoljno za potvrđivanje relevantne vrijednosti NOEC-a. U tom drugom slučaju u izvješću o ispitivanju potrebno je navesti detaljno obrazloženje za odabir granične koncentracije. Svrha je graničnog ispitivanja provesti ispitivanje s koncentracijom koja je dovoljno visoka da donositeljima odluke omogući da isključe moguće toksične učinke kemikalije, a granica se postavlja na koncentraciju za koju se ne očekuje da će se pojaviti u bilo kojoj situaciji. Preporučuje se 1 000 mg/kg (suhe mase). Obično je potrebno najmanje šest ponavljanja i za tretman i za kontrole. U Dodatku 6. navedene su neke informacije o statističkoj snazi utvrđenoj tijekom testiranja hipoteze u prstenastom ispitivanju ispitne metode.

Uvjeti izloženosti

Ispitni organizmi

39. Ispitivanje se provodi s najmanje deset crva za svako ponavljanje koje se upotrebljava za određivanje bioloških parametara. Taj broj crva odgovara količini od oko 50 do 100 mg mokre biomase. To znači da će, uz pretpostavku da udio suhe mase iznosi 17,1 % (48), svaka posuda sadržavati oko 9 do 17 mg suhe biomase. U.S. EPA (2000. (7)) preporučuje količinu

▼M6

punjenja od najviše 1: 50 (suha masa: TOC). Za formulirani sediment opisan u stavku 22. to odgovara količini od oko 43 g sedimenta (suha masa) na deset crva uz TOC od 2,0 % suhog sedimenta. U slučajevima kada se upotrebljava više od deset crva po posudi potrebno je na odgovarajući način prilagoditi količinu sedimenta i vode iznad sedimenta.

40. Svi crvi koji se upotrebljavaju u ispitivanju moraju dolaziti iz istog izvora i biti sličnog fiziološkog stanja (vidjeti Dodatak 5.). Potrebno je odabrati crve slične veličine (vidjeti stavak 39.). Preporučuje se da se prije ispitivanja izvaže poduzorak serije ili zalihe crva radi procjene prosječne mase.

41. Crvi koji se upotrebljavaju u ispitivanju vade se iz kulture (za detalje vidjeti Dodatak 5.). Velike (odrasle) životinje koje ne pokazuju znakove nedavne fragmentacije prenose se u staklene zdjelice (npr. Petrijeve zdjelice) koje sadržavaju čistu vodu. Potom se sinkroniziraju kako je opisano u Dodatku 5. Nakon regeneriranja u razdoblju od 10 do 14 dana za ispitivanje se uzimaju netaknuti čitavi crvi slične veličine koji aktivno plivaju ili gmižu nakon nježnog mehaničkog podražaja. Ako se uvjeti ispitivanja razlikuju od uvjeta uzgoja kulture (npr. u pogledu temperature, režima svjetlosti i vode iznad sedimenta), faza aklimatizacije od npr. 24 sata pri temperaturi i režimu svjetlosti te s vodom iznad sedimenta koji su jednaki onima koji će se upotrebljavati u ispitivanju trebala bi biti dovoljna da se crvi prilagode uvjetima ispitivanja. Prilagođeni se oligoheti nasumično rasporede u ispitne posude.

Hranjenje

42. S obzirom na to da se hrana dodaje u sediment prije (ili tijekom) primjene ispitivane kemikalije, crvima se tijekom ispitivanja ne daje dodatna hrana.

Svjetlo i temperatura

43. Tijekom uzgoja kulture i za vrijeme ispitivanja fotoperiod obično iznosi 16 sati (3), (7). Kako bi se oponašali prirodni uvjeti na površini sedimenta, intenzitet svjetlosti mora biti nizak (npr. 100 do 500 lx) i potrebno ga je izmjeriti najmanje jedanput tijekom razdoblja izloženosti. Temperatura mora iznositi 20 °C ± 2 °C cijelo vrijeme ispitivanja. Na dan mjerenja razlika u temperaturama ispitnih posuda ne smije biti veća od ± 1 °C. Ispitne posude potrebno je nasumično staviti u ispitni inkubator ili u ispitni prostor, npr. kako bi se pogodovanje razmnožavanju zbog položaja posuda svelo na najmanju moguću mjeru.

Dozračivanje

44. Vodu iznad sedimenta u ispitnim posudama potrebno je blago dozračivati (npr. dva do četiri mjehurića u sekundi) staklenom konusnom pipetom postavljenom oko 2 cm iznad površine sedimenta tako da se što je moguće manje poremeti sediment. Potrebno je paziti da koncentracija otopljenog kisika ne padne ispod 30 % vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV). Potrebno je kontrolirati dovod zraka te ga, ako je potrebno, prilagoditi najmanje jedanput dnevno za radnih dana.

Mjerenje kvalitete vode

45. Potrebno je mjeriti sljedeće parametre kvalitete vode iznad sedimenta:

Temperatura:	najmanje u jednoj ispitnoj posudi za svaku razinu koncentracije i u jednoj kontrolnoj posudi jedanput tjedno te na početku i na kraju razdoblja izloženosti; po mogućnosti se može bilježiti i temperatura u okolnom mediju (okolnom zraku ili vodenoj kupelji), npr. u razmacima od jednog sata;

▼M6

Sadržaj otopljenog kisika:	najmanje u jednoj ispitnoj posudi za svaku razinu koncentracije i u jednoj kontrolnoj posudi jedanput tjedno te na početku i na kraju razdoblja izloženosti; izražava se u mg/l i % ASV (vrijednosti zasićenosti kisikom);
Dovod zraka:	potrebno ga je kontrolirati najmanje jedanput dnevno za radnih dana te ga prema potrebi prilagoditi;
pH:	najmanje u jednoj ispitnoj posudi za svaku razinu koncentracije i u jednoj kontrolnoj posudi jedanput tjedno te na početku i na kraju razdoblja izloženosti;
Ukupna tvrdoća vode:	najmanje u jednoj kontrolnoj posudi i u jednoj ispitnoj posudi s najvećom koncentracijom na početku i na kraju razdoblja izloženosti; izražava se u mg/l $CaCO_3$;
Ukupan sadržaj amonijaka:	najmanje u jednoj kontrolnoj posudi i u jednoj ispitnoj posudi za svaku razinu koncentracije na početku razdoblja izloženosti, a potom tri puta tjedno; izražava se u mg/l NH_4^+ ili NH_3 ili ukupnog amonijaka-N;

Ako je za mjerenje parametara kvalitete vode potrebno uzeti znatnu količinu vode iz posuda, bilo bi preporučljivo pripremiti posebne posude za mjerenje kvalitete vode kako se ne bi promijenio omjer volumena vode i sedimenta.

Biološka opažanja

46. Tijekom izloženosti potrebno je promatrati ispitne posude kako bi se vizualno procijenile eventualne razlike u ponašanju crva (npr. izbjegavanje sedimenta, fekalni peleti vidljivi na površini sedimenta) u usporedbi s kontrolama. Opažanja je potrebno bilježiti.

47. Na kraju ispitivanja pregledava se svaka ispitna posuda (dodatne posude namijenjene za kemijske analize mogu se izuzeti iz pregledavanja). Potrebno je primijeniti odgovarajuću metodu kako bi se svi crvi izvadili iz ispitnih posuda. Potrebno je paziti da pri vađenju nijedan crv ne bude oštećen. Prosijavanje je jedna je od mogućih metoda vađenja crva iz sedimenta. Može se upotrijebiti sito od nehrđajućeg čelika s otvorima odgovarajuće veličine. Većina vode iz sedimenta pažljivo se pretoči, a preostali se sediment i voda protresu kako bi se dobila tekuća kaša koja može proći kroz sito. Ako se upotrijebi sito veličine otvora 500 μm, većina čestica sedimenta proći će vrlo brzo kroz njega; međutim, prosijavanje je potrebno izvršiti brzo kako bi se spriječilo gmizanje crva u sito ili kroz njega. Ako se upotrijebi sito veličine otvora 250 μm, spriječit će se gmizanje crva u sito ili kroz njega; međutim, potrebno je paziti da na situ ostane što je moguće manje čestica sedimenta. Prosijana kaša iz svake posude može se još jedanput prosijati kako bi se osiguralo da su svi crvi izvađeni. Alternativna je metoda zagrijavanje sedimenta stavljanjem ispitnih posuda u vodenu kupelj na 50 do 60 °C; crvi će izići iz sedimenta te ih se može pokupiti pipetom širokog otvora poliranom plamenom. Druga je alternativna metoda pretvaranje sedimenta u tekuću kašu te izlijevanje te kaše u plitku posudu prikladne veličine. Crve se može izvaditi iz plitkog sloja kaše čeličnom iglom ili urarskom pincetom (koju treba upotrijebiti prije kao vilicu nego kao kliješta, da se crvi ne oštete) te ih prenijeti u čistu vodu. Nakon što se crvi odvoje od kašastog sedimenta, ispiru se u ispitnom mediju i izbroje.

48. Neovisno o upotrijebljenoj metodi, laboratoriji moraju dokazati da je njihovo osoblje sposobno izvaditi prosječno najmanje 90 % organizama iz

▼M6

cijelog sedimenta. Primjerice, određeni broj ispitnih organizama može se dodati kontrolnom sedimentu ili ispitnim sedimentima te se nakon sat vremena može utvrditi broj izvađenih organizama (7).

49. Potrebno je zabilježiti i ocijeniti ukupan broj živih i mrtvih jedinki po ponavljanju. Sljedeće skupine crva smatraju se mrtvima:

a) ne reagiraju na nježan mehanički podražaj;

b) uočavaju se znakovi raspadanja (u kombinaciji sa skupinom „a”);

c) crvi koji nedostaju.

Živi se crvi mogu dodatno svrstati u jednu od tri skupine:

a) veliki kompletni crvi (odrasli) bez regeneriranih dijelova tijela:

b) kompletni crvi s regeneriranim dijelovima tijela svjetlije boje (tj. s novim stražnjim dijelom, s novim prednjim dijelom ili s novim stražnjim i prednjim dijelovima):

c) nekompletni crvi (tj. nedavno fragmentirani crvi s neregeneriranim dijelovima tijela).

Ta dodatna opažanja nisu obvezatna, ali mogu biti korisna za dodatno tumačenje bioloških rezultata (primjerice, veliki broj crva svrstan u skupinu c može ukazivati na kašnjenje u razmnožavanju ili regeneraciji u predmetnom tretmanu). Osim toga, ako se uoče bilo kakve razlike u izgledu (npr. lezije na integumentu, edematozni dijelovi tijela) između tretiranih i kontrolnih crva, potrebno ih je zabilježiti.

50. Odmah nakon brojenja/ocjenjivanja, živi crvi pronađeni u svakom ponavljanju prenose se u osušene, prethodno izvagane i označene plitice za vaganje (jedna po ponavljanju) te se usmrćuju primjenom kapljice etanola po plitici za vaganje. Plitice za vaganje stavljaju se u sušionik na 100 ± 5 °C kako bi se sušile preko noći, potom se izvažu nakon hlađenja u eksikatoru te se određuje suha masa crva (po mogućnosti u gramima, na najmanje četiri decimalna mjesta).

51. Osim ukupne suhe mase može se odrediti i suha masa bez pepela, kako je opisano u (49), kako bi se uzeli u obzir anorganski sastojci podrijetlom iz progutanog sedimenta koji su prisutni u probavnom traktu crva.

52. Biomasa se određuje kao ukupna biomasa po ponavljanju, uključujući odrasle i mlade crve. Mrtvi se crvi ne uzimaju u obzir za određivanje biomase po ponavljanju.

Verifikacija koncentracije ispitivane kemikalije

Uzorkovanje

53. Uzorke za kemijsku analizu ispitivane kemikalije potrebno je uzeti barem kod najveće koncentracije i jedne niže, najmanje na kraju faze uravnoteženja (prije dodavanja ispitnih organizama) i na kraju ispitivanja. Za analizu je potrebno uzrokovati najmanje sediment i vodu iznad sedimenta. Na svaki datum uzorkovanja potrebno je uzeti najmanje dva uzorka po matrici i tretmanu. Jedan od uzoraka uzetih u duplikatu može se pohraniti kao

▼M6

rezervni uzorak (koji će se analizirati npr. u slučaju kad su rezultati početne analize izvan raspona od ± 20 % nazivne koncentracije). U slučaju specifičnih kemijskih svojstava, npr. ako se očekuje brza razgradnja ispitivane kemikalije, plan analize može se prilagoditi (npr. češće uzorkovanje, analiza više razina koncentracije) na temelju stručne prosudbe. Uzorci se tada mogu uzimati u vrijeme između utvrđenih datuma uzorkovanja (npr. sedmog dana nakon početka izlaganja).

54. Vodu iznad sedimenta potrebno je uzorkovati pažljivim pretakanjem ili isisavanjem tako da se remećenje sedimenta svede na najmanju moguću mjeru. Potrebno je zabilježiti volumen uzorka.

55. Nakon što se voda iznad sedimenta ukloni, sediment je potrebno homogenizirati i prenijeti ga u prikladnu posudu. Treba zabilježiti masu uzorka mokrog sedimenta.

56. Ako se dodatno zahtijeva i analiza ispitivane kemikalije u pornoj vodi, homogenizirane i izvagane uzorke sedimenta potrebno je centrifugirati kako bi se odvojila porna voda. Primjerice, oko 200 ml mokrog sedimenta može se staviti u čaše za centrifugiranje od 250 ml. Potom je uzorke potrebno centrifugirati bez filtriranja kako bi se izdvojila porna voda, npr. na 10 000 ± 600 × *g* u trajanju od 30 do 60 minuta pri temperaturi ne većoj od one koja se primjenjuje u ispitivanju. Supernatant se nakon centrifugiranja dekantira ili izvadi pipetom, pazeći da se ne unesu čestice sedimenta, te se bilježi volumen. Treba zabilježiti masu preostalog taloga sedimenta. Taj podatak može olakšati procjenu bilance mase ili iskorištenja ispitivanje kemikalije u sustavu voda-sediment ako se na svaki datum uzorkovanja odredi suha masa sedimenta. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi jer je uzorak premalen.

57. Ako se analiza ne obavi odmah, svi se uzorci moraju uskladištiti na prikladan način, npr. u preporučenim uvjetima skladištenja koji osiguravaju minimalnu razgradnju određene ispitivane kemikalije (npr. uzorci iz okoliša obično se čuvaju u tami na – 18 °C). Prije početka istraživanja treba pribaviti informacije o pravilnim uvjetima skladištenja predmetne ispitivane kemikalije – npr. trajanje i temperatura skladištenja, postupci ekstrakcije itd.

Analitička metoda

58. Budući da čitav postupak uglavnom ovisi o točnosti, preciznosti i osjetljivosti analitičke metode koja se primjenjuje u odnosu na ispitivanu kemikaliju, potrebno je pokusima provjeriti jesu li preciznost i obnovljivost kemijske analize te izdvajanje ispitivane kemikalije iz vode i sedimenta zadovoljavajući za premetnu metodu, i to najmanje pri najnižim i najvišim ispitnim koncentracijama. Isto tako treba provjeriti može li se ispitivana kemikalija detektirati u kontrolnim posudama u koncentracijama većim od granice kvantifikacije. Ako je potrebno, nazivne se koncentracije ispravljaju kako bi se uzelo u obzir iskorištenje količina unesenih radi kontrole kvalitete (npr. ako iskorištenje nije u rasponu od 80 do 120 % unesene količine). Sa svim je uzorcima tijekom ispitivanja potrebno postupati tako da se na onečišćenja i gubici svedu na najmanju moguću mjeru (npr. nastali kao rezultat adsorpcije ispitivane kemikalije na uređaj za uzorkovanje).

59. Potrebno je zabilježiti i u izvješće uključiti iskorištenje ispitivane kemikalije, granicu kvantifikacije te granicu detekcije u sedimentu i vodi.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

60. Biomasa i ukupan broj crva po ponavljanju glavne su obvezatne varijable odgovora u ispitivanju koje je potrebno statistički ocijeniti. Po izboru se mogu ocijeniti i razmnožavanje (povećanje broja crva) te rast (povećanje suhe biomase). U tom slučaju potrebno je procijeniti suhu masu crva na početku izlaganja, npr. mjerenjem suhe mase reprezentativnog poduzorka serije sinkroniziranih crva koji će se upotrebljavati u ispitivanju.

▼M6

61. Iako smrtnost nije krajnja točka ovog ispitivanja, trebalo bi je ocijeniti u mjeri u kojoj je to moguće. Kako bi se procijenila smrtnost, crve koji ne reagiraju na blagi mehanički podražaj ili koji pokazuju znakove raspadanja te crve koji nedostaju potrebno je smatrati mrtvima. Smrtnost bi trebalo barem zabilježiti te uzeti u obzir pri tumačenju rezultata ispitivanja.

62. Koncentracije s učinkom potrebno je izraziti u mg/kg suhe mase sedimenta. Ako iskorištenje ispitivane kemikalije izmjereno u sedimentu, ili u sedimentu i vodi iznad sedimenta na početku izlaganja, iznosi između 80 i 120 % nazivnih koncentracija, koncentracije s učinkom (EC_x, NOEC, LOEC) mogu se izraziti na temelju nazivnih koncentracija. Ako iskorištenje odstupa od nominalnih koncentracija za više od ± 20 %, koncentracije s učinkom (EC_x, NOEC, LOEC) moraju se temeljiti na prvobitno izmjerenim koncentracijama na početku izlaganja, npr. uzimajući u obzir bilancu mase ispitivane kemikalije u ispitnom sustavu (vidjeti stavak 30.). U tim se slučajevima dodatne informacije mogu dobiti iz analize radnih otopina i/ili otopina za primjenu kako bi se potvrdilo da su ispitni sedimenti pravilno pripremljeni.

EC_x

63. Vrijednosti EC_x za parametre opisane u stavku 60. izračunavaju se odgovarajućim statističkim metodama (npr. probit-analizom, logističkom ili Weibullovom funkcijom, modificiranom Spearman-Karberovom metodom ili jednostavnom interpolacijom). Smjernice o statističkom ocjenjivanju navedene su u literaturi pod (15) i (50). EC_x dobiva se tako da se u dobivenu jednadžbu uvrsti vrijednost koja odgovara x postotku kontrolne srednje vrijednosti. Da bi se izračunao EC_{50} ili bilo koji drugi EC_x, srednje vrijednosti izračunane za svaki tretman ($\overline{X}$) potrebno je podvrgnuti regresijskoj analizi.

NOEC/LOEC

64. Ako se za određivanje NOEC-a namjerava primijeniti statistička analiza, potrebni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima) Potrebno je primijeniti odgovarajuće statističke metode. Općenito, štetni učinci ispitivane kemikalije u usporedbi s kontrolom istražuju se jednosmjernim testiranjem hipoteza za $p \leq 0,05$. U sljedećim se stavcima navode primjeri. Smjernice za odabir statističkih metoda navedene su u literaturi pod (15) i (50).

65. Normalna distribucija podataka može se ispitati npr. Kolmogorov-Smirnovljevim testom prikladnosti, testom omjera raspona i standardne devijacije (R/s-test) ili Shapiro-Wilkovim testom, (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Za testiranje homogenosti varijance mogu se upotrijebiti Cochranov test, Leveneov test ili Bartlettov test (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Ako su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost varijance), može se provesti jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i potom testovi višestruke usporedbe. Kako bi se izračunalo postoje li značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrola i različitih koncentracija ispitivane tvari, mogu se primijeniti usporedbe parova (npr. Dunnettov t-test) ili testovi trenda postupnim snižavanjem (npr. Williamsov test). Inače je za određivanje NOEC-a i LOEC-a potrebno primijeniti neparametarske metode (npr. Bonferronijev-U-test prema Holmu ili Jonckheere-Terpstrin test trenda).

Granično ispitivanje

66. Ako je provedeno granično ispitivanje (usporedba kontrole i samo jednog tretmana) te su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost), metrički odgovori (ukupan broj crva te biomasa kao suha masa crva) mogu se ocijeniti Studentovim testom (t-test). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, može se primijeniti t-test nejednake varijance (Welchov t-test) ili neparametarski test, kao što je Mann-Whitheyjev U-test. U Dodatku 6. navedene su neke informacije o statističkoj snazi utvrđenoj tijekom testiranja hipoteze u prstenastom ispitivanju metode.

▼M6

67. Da bi se odredile značajne razlike između kontrola (kontrola i kontrola s otapalom), ponavljanja svake kontrole mogu se testirati kako je opisano za granično ispitivanje. Ako se tim testovima ne otkriju značajne razlike, sva ponavljanja kontrole i kontrole s otapalom mogu se združiti. U protivnom se svi tretmani moraju usporediti s kontrolom s otapalom.

Tumačenje rezultata

68. Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako je bilo odstupanja od ove ispitne metode i ako se izmjerene ispitne koncentracije kreću u blizini granice detekcije analitičke metode. Treba zabilježiti sva odstupanja od ove ispitne metode.

Izvješće o ispitivanju

69. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati najmanje sljedeće informacije:

— *Ispitivana kemikalija:*

— podaci za identifikaciju kemikalije (opći naziv, kemijski naziv, strukturna formula, CAS broj itd.), uključujući čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane kemikalije; izvor ispitivane kemikalije, identitet i koncentracija upotrijebljenog otapala,

— sve informacije o fizikalnom stanju i fizikalno-kemijskim svojstvima koje su dobivene prije početka ispitivanja (npr. topljivost u vodi, tlak para, koeficijent razdjeljenja u tlu (ili u sedimentu, ako postoji), log K_{ow}, stabilnost u vodi itd.).

— *Ispitna vrsta:*

— znanstveni naziv, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, uvjeti uzgoja itd.

— *Uvjeti ispitivanja:*

— primijenjeni ispitni postupak (npr. statički, polustatički ili protočni),

— plan ispitivanja (npr. broj, materijal i veličina ispitnih komora, volumen vode po posudi, masa i volumen sedimenta po posudi, (za protočni ili polustatički postupak: brzina izmjene vode), svako dozračivanje prije i tijekom ispitivanja, broj ponavljanja, broj crva po ponavljanju na početku izlaganja, broj ispitnih koncentracija, trajanje razdoblja kondicioniranja, uravnoteženja i izlaganja, učestalost uzorkovanja),

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta,

— metoda prethodne obrade te uvođenja spikingom / primjene ispitivane kemikalije,

— nazivne ispitne koncentracije, detalji o uzorkovanju za kemijsku analizu te analitičke metode kojima su dobivene koncentracije ispitivane kemikalije,

— svojstva sedimenta kako je opisano u stavcima 24. i 25. te sva ostala mjerenja; priprema formuliranog sedimenta,

— priprema ispitne vode (ako se upotrebljava obrađena voda) i svojstva (koncentracija kisika, pH, provodljivost, tvrdoća i sva druga izvršena mjerenja) prije početka ispitivanja,

— detaljni podaci o hranjenju, uključujući i vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja,

▼M6

— intenzitet svjetlosti i fotoperiod (fotoperiodi),

— metode primijenjene za određivanja svih bioloških parametara (npr. uzorkovanje, pregled, vaganje ispitnih organizama) i svih abiotičkih parametara (npr. parametara kvalitete vode i sedimenta),

— volumeni i/ili mase svih uzoraka za kemijsku analizu,

— detaljni podaci o obradi svih uzoraka za kemijsku analizu, uključujući i pojedinosti o pripremi, skladištenju, postupcima spikinga, ekstrakciji i analitičkim postupcima (i preciznosti) za ispitivanu kemikaliju i iskorištenje ispitivane kemikalije.

— *Rezultati:*

— kakvoća vode u ispitnim posudama (pH, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, tvrdoća, koncentracija amonijaka i sva druga izvršena mjerenja),

— ukupan sadržaj organskog ugljika (TOC), omjer suhe i mokre mase, pH sedimenta i sva druga izvršena mjerenja,

— ukupan broj te, ako je utvrđen, broj kompletnih i nekompletnih crva u svakoj ispitnoj komori na kraju ispitivanja,

— suha masa crva u svakoj ispitnoj komori na kraju ispitivanja te, ako je izmjerena, suha masa poduzorka crva na početku ispitivanja,

— svaka opažena anomalija u ponašanju u usporedbi s kontrolama (npr. izbjegavanje sedimenta, prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta),

— svaka uočena smrtnost,

— procjena toksičnih krajnjih točaka (npr. EC_x, NOEC i/ili LOEC) i statističke metode koje su primijenjene za njihovo određivanje,

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama,

— sva odstupanja od kriterija valjanosti.

— *Vrednovanje rezultata:*

— sukladnost rezultata s kriterijima valjanosti navedenima u stavku 13.,

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na ishod ispitivanja koji proizlazi iz odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

(1) EC (2003.) Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I. – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

(2) OECD (2000.) Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000.) Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. U: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002.) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. U: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A. i Mattson, V. R. (1993.) Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269 – 279.

(6) Poglavlje C.27 ovog Priloga, „Test toksičnosti trzalaca (Chironomidae) u vodi iz sedimenta sa sedimentom obrađenim spikingom".

(7) U.S. EPA (2000.) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Drugo izdanje. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, ožujak 2000.

(8) Environment Canada (1997.) Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Prosinac 1997.

(9) Hill, I. R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (ur.), 1993., Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8. – 10. studenoga 1993., Renesse (NL).

(10) BBA (1995.) Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Uredili M. Streloke i H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer, C. i Schwarz-Schulz, B. (2001.) The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105 – 110.

(12) ASTM International (2004.) Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. i Gilberg, D. (2005.) Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. U suradnji s R. Nagel i B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No. 202 67 429.

(14) OECD (2000.) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003.) Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä, A., Halme, A., Kukkonen, J. V. K. (2003.) Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35 – 46.

(17) Baily, H. C. i Liu, D. H. W. (1980.) *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. str. 205. – 215. U: J. C. Eaton, P. R. Parrish i A. C. Hendricks (ur.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O. i Scheuerman, P. R. (1999.) Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271 – 278.

(19) Meyer, J. S., Boese, C. J. i Collyard, S. A. (2002.) Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D. i Ankley, G. T. (1993.) pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C. W., Mattson, V. R. Leonard, E. N. Phipps, G. L. i Ankley, G. T. (1993.) Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit, D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. i Winger, P. V. (1995.) Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885 – 1894.

(23) Kukkonen, J. i Landrum, P. F. (1994.) Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M. T. i Kukkonen, J. V. K. (1998.a) Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196 – 2202.

(25) Leppänen, M. T. i Kukkonen, J. V. K. (1998.b) Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183 – 194.

(26) Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Burton, G. A., Greenberg, M. S. i Rowland, C. D. (2002.) Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292 – 302.

(27) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J. i Kemble, N. E. (1998.) Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191 – 201.

(28) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount D. R., Huckins J., Petty. J. i Landrum, P. F. (2003.) Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872 – 885.

(29) Rodriguez, P. i Reynoldson, T. B. (1999.) Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. U: A. Mudroch, J. M. Azcue i P. Mudroch (ur.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J. i Knacker, Th. (2005.) Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271 – 280.

(31) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D. i Nagel, R. (2001.) Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, str. 2000. – 2007.

(32) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U. & Nagel, R. (2000.) Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, ožujak 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen, M. T. i Kukkonen J. V. K. (1998.) Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503 – 1508.

(34) Dermott, R. i Munawar, M. (1992.) A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407 – 414.

(35) Drewes, C. D. i Fourtner, C. R. (1990.) Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94 – 103.

(36) Brinkhurst, R. O. (1971.) A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Poglavlje C.1. ovog Priloga, „Akutna toksičnost za ribe”.

(38) OECD (1992.c) Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. i Nagel, R. (1997.) Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835 – 852.

(40) Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., i Streit, B. (1998.) Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10 – 20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. i Studinger, G. (1999.) Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26. – 27.4.1999., Hochheim/Main, Njemačka. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B. C. i Rodgers, J. H. (1993.) Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163 – 1175.

(43) Naylor, C. i Rodrigues, C. (1995.) Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291 – 3303.

(44) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J. i Smith, M. E. (1984.) Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181 – 184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I. i Navarro, E. (1999.) Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111 – 124.

(46) Environment Canada (1995.) Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P. F. (1989.) Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588 – 595.

(48) Brooke, L. T., Ankley, G. T., Call, D. J. i Cook, P. M. (1996.) Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223 – 228.

(49) Mount, D. R., Dawson, T. D. i Burkhard, L. P. (1999.) Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244 – 1249.

▼**M6**

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. i Egeler P. (2004.) Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24. – 25. ožujka, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Njemačka. str. 107. – 119.

Dodatna literatura o statističkim postupcima:

Dunnett, C. W. (1955.) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096 – 1121.

Dunnett, C. W. (1964.) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482 – 491.

Finney, D. J. (1971.) Probit Analysis (3. izd.), str. 19. – 76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D. J. (1978.) Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M. A., Russo R. C. i Thurston, R. C. (1977.) Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714 – 719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998.), 417.

Holm, S. (1979.) A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65 – 70.

Sokal, R. R. i Rohlf, F. J. (1981.) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2. izdanje. W. H. Freeman and Company. New York.

Miller, R. G., Jr. (1986.) Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro, S. S. i Wilk, M. B (1965.) An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591 – 611.

Williams, D. A. (1971.) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103 – 117.

Williams, D. A. (1972.) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 – 531.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije:

Kemikalija znači tvar ili smjesa.

Razdoblje kondicioniranja primjenjuje se kako bi se stabilizirala mikrobna komponenta sedimenta te uklonio npr. amonijak koji potječe od sastojaka sedimenta; odvija se prije nego što se ispitivana kemikalija uvede u sediment postupkom spikinga. Voda iznad sedimenta obično se baca nakon kondicioniranja.

EC_x je koncentracija ispitivane kemikalije u sedimentu koja izaziva x-postotni (npr. 50 %) učinak na biološki parametar unutar određenog razdoblja izloženosti.

Razdoblje uravnoteženja primjenjuje se kako bi omogućila raspodjela ispitivane kemikalije između čvrste faze, porne vode i vode iznad sedimenta; odvija se nakon što se ispitivana kemikalija uvede u sediment postupkom spikinga i prije dodavanja ispitnih organizama.

Faza izloženosti vrijeme je tijekom kojega su ispitni organizmi izloženi ispitivanoj kemikaliji.

Formulirani sediment ili obrađeni, umjetni ili sintetički sediment smjesa je tvari koja se upotrebljava za oponašanje fizikalnih sastojaka prirodnog sedimenta.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen značajan toksični učinak kemikalije (pri $p \leq 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a moraju imati jednak ili veći učinak od onoga koji je zabilježen pri LOEC-u. Ako se ova dva uvjeta ne mogu zadovoljiti, treba navesti detaljno obrazloženje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a).

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar određenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

Koeficijent razdjeljenja između oktanola i vode (K_{ow}; ponekad se izražava i kao P_{ow}) omjer je topljivosti kemikalije u n-oktanolu i vodi u ravnoteži te predstavlja lipofilnost kemikalije (poglavlje A.24. ovog Priloga). K_{ow} ili logaritam K_{ow} ($\log K_{ow}$) služi kao pokazatelj bioakumulacijskog potencijala kemikalije kod vodenih organizama.

Koeficijent razdjeljenja između organskog ugljika i vode (K_{oc}) omjer je koncentracije kemikalije u/na dijelu tla s organskim ugljikom i koncentracije kemikalije u vodi u ravnoteži.

Voda iznad sedimenta je voda koja u ispitnoj posudi pokriva sediment.

Porna voda ili međuprostorna voda je voda u prostoru između sedimenta i čestica tla.

Sediment obrađen spikingom je sediment u koji je dodana ispitivana kemikalija.

Ispitivana kemikalija znači svaka tvar ili smjesa koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M6

Dodatak 2.

Sastav preporučene obrađene vode

(preuzeto iz poglavlja C.1. ovog Priloga (1))

(a) *Otopina kalcijeva klorida*

Otopiti 11,76 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 litre

(b) *Otopina magnezijeva sulfata*

Otopiti 4,93 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 litre

(c) *Otopina natrijeva bikarbonata*

Otopiti 2,59 g $NaHCO_3$ u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 litre

(d) *Otopina kalijeva klorida*

Otopiti 0,23 g KCl u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 litre

Sve kemikalije moraju biti analitičkog stupnja čistoće.

Provodljivost destilirane ili deionizirane vode ne smije biti veća od 10 μScm^{-1}.

Pomiješati po 25 ml svake od otopina od (a) do (d) i nadopuniti deioniziranom vodom do 1 litre. Zbroj kalcijevih i magnezijevih iona u tim otopinama iznosi 2,5 mmol/l.

Omjer iona Ca i Mg je 4: 1, a iona Na i K je 10: 1. Kapacitet kiselosti $K_{S4.3}$ te otopine iznosi 0,8 mmol/l.

Vodu za razrjeđivanje dozračivati dok se ne postigne zasićenje kisikom te je bez dozračivanja čuvati oko dva dana prije uporabe.

IZVOR

(1) Poglavlje C.1. ovog Priloga, „Akutna toksičnost za ribe”.

▼**M6**

Dodatak 3.

Fizikalno-kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

Sastojak	Koncentracije
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 µg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l
(preuzeto iz OECD (1992.) (1))	

IZVOR

(1) OECD (1992.) Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariz.

▼M6

Dodatak 4.

Preporučeni umjetni sediment – smjernice za pripremu i čuvanje

Sastojci sedimenta

Sastojak	Svojstva	% suhe mase sedimenta
Treset	Tresetna mahovina (Sphagnum moss), stupanj raspadanja: „srednji”, sušen na zraku, bez vidljivih ostataka bilja, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % mora biti veličine između 50 i 200 μm	75 – 76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20 ± 1
Izvor hrane	npr. kopriva u prahu (Folia urticae), listovi Urtica dioica (velika kopriva), fino usitnjeni (veličina čestica ≤ 0,5 mm); u skladu s farmaceutskim standardima, za prehranu ljudi; dodani suhom sedimentu	0,4 – 0,5 %
Organski ugljik	Prilagođava se dodavanjem treseta i pijeska	2 ± 0,5
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, u prahu, kemijskog stupnja čistoće, dodan suhom sedimentu	0,05 – 1
Deionizirana voda	Provodljivost ≤ 10 μS/cm, dodana suhom sedimentu	30 – 50

Napomena: ako se očekuju povišene koncentracije amonijaka, npr. ako je poznato da ispitivana kemikalija inhibira nitrifikaciju, može biti korisno 50 % koprive u prahu bogate dušikom zamijeniti celulozom (npr. α-celulozom u prahu, kemijski čistom, veličine čestica ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Priprema

Treset se suši na zraku i usitnjava u fini prah. Pripremi se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u deioniziranoj vodi s pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti. pH te suspenzije prilagođava se na 5,5 ± 0,5 s pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se kondicionira najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizirala pH-vrijednost i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH-vrijednost ponovno se mjeri i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskom glinom) i deioniziranom vodom da se dobije homogeni sediment sa sadržajem vode u području od 30 do 50 % suhe mase sedimenta. pH konačne smjese ponovno se mjeri i prema potrebi prilagođava na 6,5 do 7,5 s pomoću $CaCO_3$. Međutim, ako se očekuje nastanak amonijaka, može biti korisno održavati pH sedimenta ispod 7,0 (npr. između 6,0 i 6,5). Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i sadržaj organskog ugljika. Ako se očekuje nastanak amonijaka, formulirani sediment može se kondicionirati sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju u sljedećem ispitivanju (npr. omjer sedimenta i vode 1: 4, visina sloja sedimenta kao i u ispitnim posudama) prije nego što se u njega uvede ispitna kemikalija postupkom spikinga, tj. potrebno ga je prekriti vodom koja mora biti dozračena. Na kraju razdoblja kondicioniranja vodu iznad sedimenta potrebno je ukloniti i baciti. Potom se kremeni pijesak koji je obrađen

▼M6

spikingom pomiješa sa sedimentom za svaku razinu tretmana, a sediment se raspodijeli po ispitnim posudama koje služe za ponavljanja i prekrije ispitnom vodom. Posude se zatim inkubiraju u istim uvjetima koji prevladavaju u sljedećem ispitivanju. Tada započinje razdoblje uravnoteženja. Vodu iznad sedimenta potrebno je dozračivati.

Odabrani izvor hrane potrebno je dodati prije ili tijekom uvođenja ispitivane kemikalije u sediment postupkom spikinga. Može se prethodno pomiješati sa suspenzijom treseta (vidjeti ranije u tekstu). Međutim, pretjerano raspadanje izvora hrane prije dodavanja ispitnih organizama – npr. u slučaju dugog razdoblja uravnoteženja – može se izbjeći tako što će se osigurati da vrijeme između dodavanja hrane i početka izlaganja bude što je moguće kraće. Kako bi se osiguralo da je ispitivana kemikalija unesena u hranu, izvor hrane potrebno je pomiješati sa sedimentom najkasnije na dan kad se ispitivana kemikalija unosi u sediment postupkom spikinga.

Skladištenje

Suhi sastojci umjetnog sedimenta mogu se skladištiti na suhom i hladnom mjestu ili na sobnoj temperaturi. Pripremljeni sediment u koji je ispitivana kemikalija unesena postupkom spikinga mora biti odmah upotrijebljen u ispitivanju. Uzorci sedimenta obrađenog spikingom mogu se skladištiti do analize u uvjetima preporučenima za određenu ispitivanu kemikaliju.

IZVORI

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. & Gilberg, D. (2005.) Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. U suradnji s R. Nagel i B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No. 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. i Egeler P. (2004.) Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Njemačka. str. 107. – 119.

▼M6

Dodatak 5.

Metode uzgoja *Lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta, živi u slatkovodnim sedimentima i često se upotrebljava u ekotoksikološkim ispitivanjima. Može se lako uzgajati u laboratorijskim uvjetima. U nastavku su ukratko opisane metode uzgoja.

Metode uzgoja

Uvjeti uzgoja za *Lumbriculus variegatus* detaljno su opisani u Phipps i sur. (1993.) (1), Brunson i sur. (1998.) (2), ASTM (2000.) (3), US EPA (2000.) (4). Ti su uvjeti sažeto navedeni u nastavku. Glavna je prednost crva *L. variegatus* u tome da se brzo razmnožavaju, što dovodi do brzog povećanja biomase kod populacija uzgajanih u laboratoriju (npr. (1), (3), (4), (5)).

Crvi se mogu uzgajati u velikim akvarijima (57 – 80 l) na 23 °C pri fotoperiodu od 16 sati svjetla (100 – 1 000 lx) i osam sati tame te uz svakodnevno obnavljanje prirodne vode (45 do 50 l po akvariju). Supstrat se priprema tako da se smeđi neizbijeljeni papirnati ručnici izrežu na vrpce koje se potom mogu nekoliko sekundi miješati s vodom za uzgoj kulture kako bi se dobili komadići papirnatog supstrata. Taj se supstrat može izravno upotrijebiti za prekrivanje dna bazena u akvarijima za uzgoj crva *Lumbriculus* ili se može čuvati zamrznut u deioniziranoj vodi za kasniju uporabu. Novi supstrat u bazenu obično traje oko dva mjeseca.

Svaki uzgoj kulture crva započinje s 500 do 1 000 crva, koji se hrane suspenzijom od 10 ml koja sadržava 6 g početne hrane za pastrve, i to tri puta tjedno u uvjetima obnavljanja vode ili protočnim uvjetima. Za statičke ili polustatičke kulture potrebno je smanjiti brzinu hranjenja kako bi se spriječio rast bakterija i gljivica.

U tim se uvjetima broj jedinki u kulturi obično udvostruči za oko 10 do 14 dana.

Lumbriculus variegatus moguće je uzgajati i u sustavu koji se sastoji od sloja kremenog pijeska kakav se upotrebljava za umjetni sediment (debljine 1 do 2 cm) i obrađene vode. Spremnici od stakla ili nehrđajućeg čelika visine od 12 do 20 cm mogu se upotrijebiti kao uzgojne posude. Vodu treba blago dozračivati (npr. dva mjehurića u sekundi) Pasteurovom pipetom postavljenom oko 2 cm iznad površine sedimenta. Kako bi se izbjeglo nakupljanje npr. amonijaka, vodu iznad sedimenta treba mijenjati protočnim sustavom ili barem jedanput tjedno ručno. Oligoheti se mogu držati na sobnoj temperaturi pri fotoperiodu od 16 sati svjetla (intenziteta od 100 do 1 000 lx) i osam sati tame. Kod polustatičke kulture (obnavljanje vode jedanput tjedno) crve se dva puta tjedno hrani hranom TetraMin (npr. 0,6 do 0,8 mg po cm^2 površine sedimenta), koja se može primijeniti u obliku suspenzije od 50 mg hrane TetraMin po mililitru deionizirane vode.

Lumbriculus variegatus mogu se izvaditi iz kulture npr. tako da se u posebnu laboratorijsku čašu prenese supstrat s pomoću fine mrežice ili da se organizmi prenesu s pomoću staklene pipete širokog otvora polirane plamenom (promjera oko 5 mm). Ako se istodobno prenosi i supstrat, laboratorijska čaša koja sadržava crve i supstrat ostavlja se preko noću u protočnim uvjetima u kojima će se iz čaše ukloniti supstrat, dok će crvi ostati na dnu posude. Crvi se potom mogu prenijeti u novopripremljene bazene za uzgoj ili se mogu dodatno obraditi za ispitivanje na način opisan u (3) i (4) ili u nastavku.

Kada se u testovima sa sedimentom upotrebljava *L. variegatus*, od ključne je važnosti voditi računa o njezinu načinu razmnožavanja (arhitomija ili morfalaksa, npr. (6)). Takvim nespolnim razmnožavanjem nastaju dva fragmenta koji ne uzimaju hranu određeno vrijeme dok im se ne regeneriraju glava ili rep (npr. (7), (8)). To znači da se kod *L. variegatus* izlaganje putem gutanja kontaminiranog sedimenta ne odvija neprekidno.

▼M6

Stoga je potrebno provesti sinkronizaciju kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri smanjilo nekontrolirano razmnožavanje i regeneriranje, a time i kasnija velika odstupanja u rezultatima ispitivanja. Do takvog odstupanja može doći kada su neke jedinke, koje su se fragmentirale i stoga određeno vrijeme ne uzimaju hranu, manje izložene ispitivanoj kemikaliji od drugih jedinki koje se nisu fragmentirale tijekom ispitivanja (9), (10), (11). Crve je potrebno umjetno fragmentirati (sinkronizacija) 10 do 14 dana prije početka izlaganja. Za sinkronizaciju je potrebno izabrati velike (odrasle) crve koji po mogućnosti ne pokazuju znakove nedavne morfalakse. Ti se crvi mogu staviti na stakalce u kapljicu vode za uzgoj kulture te skalpelom presjeći na sredini tijela. Potrebno je paziti da im stražnji dijelovi budu slične veličine. Potom je potrebno pustiti da se do početka izlaganja na stražnjim dijelovima regeneriraju glave u uzgojnoj posudi koja sadržava isti supstrat kao što je onaj koji se upotrebljava u uzgoju kulture te obrađenu vodu. Ako sinkronizirani crvi počnu rovati po supstratu, znači da je došlo do regeneracije glava (prisutnost regeneriranih glava može se potvrditi pregledom reprezentativnog poduzorka binokularnim mikroskopom). Tada se očekuje da su ispitni organizmi sličnog fiziološkog stanja. To znači da kada se tijekom ispitivanja sinkronizirani crvi razmnože morfalaksom, očekuje se da će gotovo sve životinje biti jednako izložene sedimentu obrađenom spikingom. Sinkronizirane crve treba nahraniti čim počnu rovati po supstratu ili sedam dana nakon disekcije. Režim hranjenja mora biti sličan onome kod uobičajenih kultura, ali bi bilo preporučljivo sinkronizirane crve hraniti istim izvorom hrane kao što je onaj koji će se upotrebljavati u ispitivanju. Crve je potrebno držati na ispitnoj temperaturi od 20 ± 2 °C. Nakon regeneracije, neoštećene kompletne crve koji na blagi mehanički podražaj aktivno plivaju ili gmižu treba upotrijebiti za ispitivanje. Potrebno je spriječiti ozljede ili autotomiju kod crva, npr. tako što će se za rukovanje crvima upotrijebiti pipete čiji su rubovi polirani plamenom ili zubarske pincete od nehrđajućeg čelika.

Izvori početnih kultura za *Lumbriculus variegatus* (adrese u SAD-u preuzete iz (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Njemačka

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Njemačka

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finska

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Njemačka

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

SAD

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

IZVORI:

(1) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A. i Mattson, V. R. (1993.) Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269 – 279.

(2) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J. i Kemble, N. E. (1998.) Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191 – 201.

(3) ASTM International (2000.) Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) US EPA (2000.) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, ožujak 2000.

(5) Kukkonen, J. i Landrum, P. F. (1994.) Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457 – 1468.

(6) Drewes C. D. i Fourtner C. R. (1990.) Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94 – 103.

(7) Leppänen, M. T. i Kukkonen, J. V. K. (1998.a) Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196 – 2202.

(8) Leppänen, M. T. i Kukkonen, J. V. K. (1998.b) Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183 – 194.

(9) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann D. i Nagel, R. (2001.) Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, str. 2000. – 2007.

(10) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U. i Nagel, R. (2000.) Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, ožujak 2000.

(11) Leppänen, M. T. i Kukkonen, J. V. K. (1998.) Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503 – 1508.

▼M6

Dodatak 6.

Sažetak rezultata prstenastog ispitivanja

„Ispitivanje toksičnosti sedimenta s *Lumbriculus variegatus*"

Tablica 1.

Rezultati pojedinačnih ciklusa prstenastog ispitivanja: srednji broj crva u kontrolama i u kontrolama s otapalom na kraju ispitivanja; SD = standardna devijacija; CV = koeficijent varijacije.

	Srednji broj crva u kontrolama	SD	CV (%)	n	Srednji broj crva u kontrolama s otapalom	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
međulaboratorijska srednja vrijednost	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
minimalno	**16,3**				**15,0**			
maksimalno	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tablica 2.

Rezultati pojedinačnih ciklusa prstenastog ispitivanja: srednja ukupna suha masa crva po ponavljanju u kontrolama i kontrolama s otapalom na kraju ispitivanja; SD = standardna devijacija; CV = koeficijent varijacije.

	ukupna suha masa crva po ponavljanju (u kontrolama)	SD	CV (%)	n	ukupna suha masa crva po ponavljanju (u kontrolama s otapalom)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
međulaboratorijska srednja vrijednost	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
minimalno	**12,9**				**10,5**			
maksimalno	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tablica 3.

Toksičnost PCP-a: sažeti prikaz krajnjih točaka u prstenastom ispitivanju; međulaboratorijska srednja vrijednost za EC_{50}, NOEC i LOEC; SD = standardna devijacija; CV = koeficijent varijacije.

biološki parametar		međulaboratorijska srednja vrijednost (mg/kg)	minimalno	maksimalno	međulaboratorijski faktor	SD	CV (%)	geometrijska srednja vrijednost (mg/kg)
ukupan broj crva	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
ukupna suha masa crva	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
smrtnost/ preživljavanje	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
razmnožavanje (povećanje broja crva po ponavljanju)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
rast (povećanje biomase po ponavljanju)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: minimalna razlika u odnosu na kontrolne vrijednosti koju je moguće otkriti tijekom testiranja hipoteze; upotrebljava se kao mjera statističke snage

IZVOR:

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. i Gilberg, D. (2005.) Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. U suradnji s R. Nagel i B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No. 202 67 429.

▼M6

C.36. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI U TLU ZA GRABEŽLJIVU GRINJU (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 226 (2008.). Ova je ispitna metoda namijenjena procjeni učinaka kemikalija u tlu na reprodukcijsku uspješnost grabežljive grinje u tlu vrste *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) i omogućuje procjenu inhibicije brzine specifičnog rasta populacije (1), (2). Reprodukcijska uspješnost ovdje znači broj mladih jedinki na kraju razdoblja ispitivanja. *H. aculeifer* predstavlja dodatnu trofičku razinu vrstama za koje su ispitne metode već dostupne. Smatra se da je za potrebe ove ispitne metode dovoljno ispitati reproduktivnu toksičnost bez razlikovanja i kvantifikacije različitih faza reproduktivnog ciklusa. Za kemikalije za koje scenarij izlaganja ne uključuje tlo možda će bolje odgovarati neki drugi pristupi (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* smatra se relevantnim predstavnikom faune tla, posebno grabežljivih grinja. Rasprostranjena je širom svijeta (5) te se može lako prikupljati i uzgajati u laboratoriju. Sažetak biologije vrste *H. aculeifer* naveden je u Dodatku 7. Osnovne informacije o ekologiji vrsta grinja i njihovoj uporabi u ekotoksikološkim ispitivanjima mogu se pronaći u literaturi (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

NAČELO ISPITIVANJA

3. Odrasle se ženke izlažu nizu koncentracija ispitivane kemikalije umiješane u tlo. Ispitivanje započinje s deset odraslih ženki po ispitnoj posudi. Mužjaci nisu uključeni u ispitivanje jer je iskustvo pokazalo da se u prisutnosti mužjaka ženke pare odmah ili brzo nakon izlaska iz faze deutonimfe. Osim toga, uključivanjem mužjaka ispitivanje bi se produljilo jer bi uključivalo i zahtjevan posao utvrđivanja faza razvoja. Stoga parenje samo po sebi nije obuhvaćeno ispitivanjem. Ženke se uvode u ispitivanje 28 do 35 dana nakon početka razdoblja polaganja jajašaca u procesu sinkronizacije (vidjeti Dodatak 4.), jer se može smatrati da su se ženke tada već parile i da su prošle fazu predovipozicije. Pri temperaturi od 20 °C ispitivanje završava 14. dana nakon uvođenja ženki (dan 0.), a to je razdoblje koje omogućuje da prvi potomci u kontrolama dosegnu fazu deutonimfe (vidjeti Dodatak 4.). Za glavnu mjerenu varijablu utvrđuje se broj mladih jedinki po ispitnoj posudi i, dodatno, broj preživjelih ženki. Reprodukcijska uspješnost grinja izloženih ispitivanoj kemikaliji uspoređuje se s onom u kontrolama kako bi se odredila vrijednost EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) ili najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) (vidjeti dodatak 1. za definicije), ovisno o planu pokusa (vidjeti stavak 29.). U Dodatku 8. naveden je pregled vremenskog rasporeda ispitivanja.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

4. Po mogućnosti, trebali bi biti poznati topljivost u vodi, log K_{ow}, koeficijent razdjeljenja između tla i vode te tlak para ispitivane kemikalije. Poželjno je imati i dodatne informacije o sudbini ispitivane kemikalije u tlu, kao što su brzina biotičke i abiotičke razgradnje.

5. Ova se ispitna metoda može upotrebljavati za kemikalije koje su topljive u vodi, kao i za one koje nisu topljive u vodi. Ovisno o tome, razlikovat će se i način primjene ispitivane kemikalije. Ova ispitna metoda nije primjenljiva na hlapljive kemikalije, tj. kemikalije za koje su Henryjeva konstanta ili koeficijent razdjeljenja između zraka i vode veći od jedan ili kemikalije čiji je tlak para veći od 0,0133 Pa pri 25 °C.

▼M6

VALJANOST ISPITIVANJA

6. Da bi se rezultat ispitivanja smatrao valjanim, netretirane kontrole moraju zadovoljavati sljedeće kriterije:

— srednja smrtnost odraslih ženki na kraju ispitivanja ne smije biti viša od 20 %,

— srednji broj mladih jedinki po ponavljanju (s uvedenih deset odraslih ženki) mora biti najmanje 50 na kraju ispitivanja,

— koeficijent varijacije izračunan za broj mladih grinja po ponavljanju ne smije biti veći od 30 % na kraju glavnog ispitivanja.

REFERENTNA KEMIKALIJA

7. Moraju se odrediti EC_x i/ili NOEC referentne kemikalije kako bi se zajamčilo da su uvjeti laboratorijskog ispitivanja odgovarajući te kako bi se potvrdilo da se odgovor ispitnih organizama nije promijenio tijekom vremena. Dimetoat (CAS 60-51-5) prikladna je referentna kemikalija za koju je pokazano da utječe na veličinu populacije (4). Kao alternativna referentna kemikalija može se upotrijebiti borna kiselina (CAS 10043-35-3). S tom je kemikalijom stečeno manje iskustva. Moguća su dva plana pokusa:

— Referentna se kemikalija može ispitivati usporedno s određivanjem toksičnosti svake ispitivane kemikalije u jednoj koncentraciji za koju se mora prethodno dokazati, istraživanjem odnosa između doze i odgovora, da za učinak ima smanjenje broja potomaka za > 50 %. U tom slučaju broj ponavljanja mora biti jednak broju ponavljanja u kontrolama (vidjeti stavak 29.).

— Druga je mogućnost da se referentna kemikalija ispita jedan do dva puta godišnje u okviru ispitivanja odnosa između doze i odgovora. Ovisno o odabranom planu, razlikuju se broj koncentracija i ponavljanja te faktor razmaka (vidjeti stavak 29.), ali je potrebno postići odgovor od 10 do 90 % učinka (faktor razmaka od 1,8). Vrijednost EC_{50} za dimetoat, izračunana na temelju broja mladih jedinki, mora biti unutar raspona od 3,0 do 7,0 mg a. t. / kg tla (suha masa). Na temelju rezultata koji su do sada dobiveni s bornom kiselinom, vrijednost EC_{50} izračunana na temelju broja mladih jedinki mora biti unutar raspona od 100 do 500 mg / kg suhe mase tla.

OPIS ISPITIVANJA

Ispitne posude i oprema

8. Potrebno je upotrebljavati ispitne posude promjera 3 do 5 cm (visina tla ≥ · 1,5 cm), izrađene od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala te opremljene čvrsto prianjajućim poklopcem. Poželjno je da to budu poklopci na navoj te se u tom slučaju posude mogu dozračiti dvaput tjedno. Alternativno se mogu upotrijebiti poklopci koji omogućuju izravnu razmjenu plinova između supstrata i atmosfere (npr. gaza). Budući da se tijekom ispitivanja mora održavati dovoljno visok sadržaj vlage, ključno je tijekom ispitivanja provjeravati masu svake pokusne posude te prema potrebi nadopunjavati vodu. To može biti posebno važno ako poklopci na navoj nisu na raspolaganju. Ako se upotrebljava neprozirna ispitna posuda, poklopac mora biti izrađen od materijala koji propušta svjetlost (npr. perforirani prozirni poklopac) i istodobno sprječava izlazak grinja. Veličina i vrsta ispitne posude ovise o metodi ekstrakcije (za detalje vidjeti Dodatak 5.). Ako se ekstrakcija toplinskim postupkom primjenjuje izravno na ispitnu posudu, na dno se može staviti rešetka s otvorima odgovarajućih dimenzija (koja ostaje pričvršćena do ekstrakcije), a dubina tla mora biti dovoljna da omogući uspostavu gradijenta temperature i vlage.

▼M6

9. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema, a posebno:

— po mogućnosti, staklene posude s poklopcima na navoj,

— ormar za sušenje,

— stereomikroskop,

— četke za prenošenje grinja,

— pH-metar i luksometar,

— prikladne precizne vage,

— odgovarajuća oprema za kontrolu temperature,

— odgovarajuća oprema za kontrolu vlažnosti zraka (nije nužna ako su ispitne posude pokrivene poklopcima),

— inkubator ili manja prostorija s kontroliranom temperaturom,

— oprema za ekstrakciju (vidjeti Dodatak 5.) (13),

— viseća panel-svjetiljka s regulatorom svjetlosti,

— staklenke za sakupljanje ekstrahiranih grinja.

Priprema umjetnog tla

10. Za ovo se ispitivanje upotrebljava umjetno tlo. Umjetno tlo sadržava sljedeće sastojke (sve se vrijednosti temelje na suhoj masi):

— 5 % sphagnum treseta, sušenog na zraku i fino usitnjenog (prihvatljiva je veličina čestica od 2 ± 1 mm),

— 20 % kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %),

— oko 74 % industrijskog pijeska sušenog na zraku (ovisno o potrebnoj količini $CaCO_3$), pretežno finog pijeska s više od 50 % čestica veličine između 50 i 200 mikrona. Točna količina pijeska ovisi o količini $CaCO_3$ (vidjeti u nastavku), zajedno bi trebali činiti 75 %,

— < 1,0 % kalcijeva karbonata ($CaCO_3$, u prahu, analitičkog stupnja čistoće) da bi se dobio pH od 6,0 ± 0,5; količina kalcijeva karbonata koju je potrebno dodati može u prvom redu ovisiti o kvaliteti/prirodi treseta (vidjeti napomenu 1.).

Napomena 1.: Količina potrebnog $CaCO_3$ ovisit će o sastojcima supstrata tla i potrebno ju je odrediti mjerenjem pH-vrijednosti poduzoraka tla neposredno prije ispitivanja (14).

Napomena 2.: Sadržaj treseta u ovom umjetnom tlu drukčiji je nego kod drugih metoda ispitivanja na organizmima iz tla kod kojih se u većini slučajeva upotrebljava 10 % treseta (npr. (15)). Međutim, prema EPPO-u (16), tipično poljoprivredno tlo ima najviše 5 % organske tvari pa stoga smanjenje sadržaja treseta odražava smanjenu sorpcijsku sposobnost prirodnog tla da ispitivanu kemikaliju veže na organski ugljik.

Napomena 3.: Prema potrebi, npr. za posebne ispitne svrhe, prirodna tla s neonečišćenih mjesta mogu isto tako poslužiti kao ispitno tlo i/ili supstrat za uzgoj kultura. Međutim, ako se upotrebljava prirodno tlo, potrebno mu je odrediti barem podrijetlo (mjesto uzimanja), pH, teksturu (granulometrijski sastav) i sadržaj organske tvari. Ako postoje, treba navesti vrstu i naziv tla

▼M6

prema klasifikaciji tla i tlo ne smije biti kontaminirano. Ako je ispitivana kemikalija metal ili organometal, za prirodno tlo treba odrediti i kapacitet izmjene kationa (CEC). Posebnu pozornost treba posvetiti tomu da se ispune kriteriji valjanosti jer su referentne informacije o prirodnim tlima obično rijetke.

11. Suhi sastojci tla temeljito se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijskoj miješalici). Za određivanje pH-vrijednosti upotrebljava se smjesa tla s otopinom 1 M kalijeva klorida (KCl) ili 0,01 M kalcijeva klorida ($CaCl_2$) u omjeru 1: 5 (vidjeti (14) i Dodatak 3.). Ako kiselost tla nije unutar zahtijevanog raspona (vidjeti stavak 10.), može se prilagoditi dodavanjem odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ako je tlo previše lužnato, može se prilagoditi tako da se doda više smjese koja sadržava prva tri sastojka opisana u stavku 10., ali da se isključujući $CaCO_3$.

12. Maksimalni vodni kapacitet (WHC) umjetnog tla određuje se u skladu s postupcima opisanima u Dodatku 2. Dva do sedam dana prije početka ispitivanja suho umjetno tlo vlaži se dodavanjem dovoljno destilirane ili deionizirane vode da se dobije otprilike pola konačnog sadržaja vode, tj. 40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta. Sadržaj vlage prilagođava se na 40 do 60 % maksimalnog WHC-a dodavanjem otopine ispitivane kemikalije i/ili dodavanjem destilirane ili deionizirane vode (vidjeti stavke 16. do 18.). Vlažnost tla može se dodatno ugrubo procijeniti laganim gnječenjem rukom: ako je sadržaj vlage ispravan, među prstima bi se trebale pojaviti kapljice vode.

13. Sadržaj vlage u tlu određuje se na početku i na kraju ispitivanja sušenjem na 105 °C do stalne mase u skladu s normom ISO 11465 (17), a pH-vrijednost tla u skladu s Dodatkom 3. ili normom ISO 10390 (14). Ta se određivanja provode na dodatnim uzorcima bez grinja, uzetima iz kontrolnog tla i iz tla svake ispitne koncentracije. pH-vrijednost tla nije potrebno prilagođavati ako se ispituju kisele ili lužnate kemikalije. Sadržaj vlage potrebno je pratiti tijekom cijelog ispitivanja periodičnim vaganjem posuda (vidjeti stavke 20. i 24.).

Odabir i priprema ispitnih životinja

14. U ispitivanju se upotrebljava vrsta *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883.). Za početak ispitivanja potrebne su odrasle ženke grinja dobivene iz sinkronizirane skupine. Grinje je potrebno uvesti u ispitivanje otprilike sedam do 14 dana nakon što postanu odrasle, 28 do 35 dana nakon početka polaganja jajašaca u procesu sinkronizacije (vidjeti stavak 3. i Dodatak 4.). Potrebno je evidentirati izvor grinja ili dobavljača te održavanje kulture u laboratoriju. Ako se kultura održava u laboratoriju, preporučuje se identificirati vrstu najmanje jedanput godišnje. List za identifikaciju naveden je u Dodatku 6.

Priprema ispitnih koncentracija

15. Ispitna se kemikalija umiješa u tlo. Organska otapala za lakše tretiranje tla ispitivanom kemikalijom potrebno je odabrati na temelju njihove niske toksičnosti za grinje te u plan ispitivanja treba uključiti odgovarajuću kontrolu s otapalom (vidjeti stavak 29.).

Ispitivana kemikalija topljiva u vodi

16. Otopina ispitivane kemikalije priprema se u deioniziranoj vodi u količini dovoljnoj za sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Preporučuje se upotrijebiti odgovarajuću količinu vode da se postigne potreban sadržaj vlage, tj. 40 do 60 % maksimalnog WHC-a (vidjeti stavak 12.). Svaka se otopina ispitivane kemikalije temeljito izmiješa s jednom šaržom prethodno navlaženog tla prije nego što se uvede u ispitnu posudu.

▼M6

Ispitivana kemikalija netopljiva u vodi

17. Ispitivana kemikalija koja nije topljiva u vodi, ali je topljiva u organskim otapalima, može se otopiti u najmanjoj mogućoj količini prikladnog nosača (npr. acetona). Trebalo bi upotrebljavati samo hlapljiva otapala. Ako se upotrebljavaju takvi nosači, sve ispitne koncentracije i kontrola moraju sadržavati istu minimalnu količinu nosača. Nosač se poprska po maloj količini, npr. 10 g, finog kremenog pijeska ili se pomiješa s njom. Ukupan sadržaj pijeska u supstratu potrebno je ispraviti kako bi se uzela u obzir ta količina. Nosač se uklanja isparavanjem u digestoru najmanje jedan sat. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije dodaje prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa uz dodavanje odgovarajuće količine deionizirane vode da se dobije potreban sadržaj vlage. Konačna se smjesa unosi u ispitne posude. Potrebno je napomenuti da neka otapala mogu biti toksična za grinje. Stoga se preporučuje upotrijebiti dodatnu kontrolu s vodom bez nosača ako njegova toksičnost za grinje nije poznata. Ako se na primjeren način dokaže da otapalo (u koncentracijama koje će se primjenjivati) nema učinka, kontrola s vodom može se isključiti.

Ispitivana kemikalija koja je slabo topljiva u vodi i u organskim otapalima

18. Za kemikalije koje su slabo topljive u vodi i u organskim otapalima, 2,5 g fino usitnjenog kremenog pijeska po ispitnoj posudi (npr. 10 g finog kremenog pijeska za četiri ponavljanja) pomiješa se s potrebnom količinom ispitivane kemikalije da se dobije željena ispitna koncentracija. Ukupan sadržaj pijeska u supstratu potrebno je ispraviti kako bi se uzela u obzir ta količina. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije dodaje prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa nakon dodavanja odgovarajuće količine deionizirane vode da se dobije potreban sadržaj vlage. Konačna se smjesa podijeli na ispitne posude. Navedeni se postupak ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a pripremi se i odgovarajuća kontrola.

POSTUPAK

Ispitne skupine i kontrole

19. Za svaku kontrolnu posudu i posudu koja će se tretirati preporučuje se upotrijebiti deset odraslih ženki u 20 g suhe mase umjetnog tla. Ispitne organizme potrebno je dodati u roku od dva sata nakon pripreme konačnog ispitnog supstrata (tj. nakon primjene ispitivane tvari). U posebnim slučajevima (npr. kada se odležavanje smatra odlučujućim faktorom), vrijeme između pripreme konačnog ispitnog supstrata i dodavanja grinja može se produljiti (za detalje o takvom odležavanju vidi (18)). Međutim, u tim se slučajevima mora navesti znanstveno obrazloženje.

20. Grinje se nahrane nakon dodavanja u tlo te se svaka ispitna posuda izvaže kako bi se dobila početna masa koja će služiti kao referentna vrijednost za praćenje sadržaja vlage u tlu tijekom ispitivanja, kako je opisano u stavku 24. Ispitne se posude potom prekrivaju na način opisan u stavku 8. i stavljaju u ispitnu komoru.

21. Za svaku metodu primjene ispitivane kemikalije opisanu u stavcima od 15. do 18. pripremaju se odgovarajuće kontrole. Kontrole se pripremaju u skladu s odgovarajućim postupcima, osim što se ne dodaje ispitivana kemikalija. Prema tomu, kontrolama se prema potrebi dodaju organska otapala, kremeni pijesak ili drugi nosači u koncentracijama/količinama jednakima onima u tretmanima. Ako se ispitivana kemikalija dodaje s pomoću otapala ili nekog drugog nosača, potrebno je pripremiti i dodatnu kontrolu bez nosača ili ispitivane kemikalije te je ispitati ako toksičnost nosača nije poznata (vidjeti stavak 17.).

▼M6

Uvjeti ispitivanja

22. Ispitna temperatura mora iznositi 20 ± 2 °C. Temperaturu treba bilježiti najmanje jednom dnevno te je prilagoditi prema potrebi. Ispitivanje se provodi uz kontrolirane cikluse izmjene svjetlosti i tame (po mogućnosti 16 sati svjetla i osam sati tame) uz osvjetljenje od 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda. Radi usporedivosti, ti su uvjeti jednaki onima koji se primjenjuju u drugim ekotoksikološkim ispitivanjima u tlu (npr. (15)).

23. Izmjenu plinova potrebno je osigurati dozračivanjem ispitnih posuda najmanje dvaput tjedno ako se upotrebljavaju poklopci na navoj. Ako se za pokrivanje posuda upotrebljava gaza, posebnu pozornost treba posvetiti održavanju vlažnosti tla (vidjeti stavke 8. i 24.).

24. Sadržaj vode u supstratu tla u ispitnim posudama održava se tijekom cijelog ispitivanja periodičnim vaganjem ispitnih posuda i, ako je potrebno, dodavanjem vode (npr. jednom tjedno). Gubici se prema potrebi nadoknađuju deioniziranom vodom. Tijekom ispitivanja sadržaj vlage ne smije varirati za više od ± 10 % početne vrijednosti.

Hranjenje

25. Pokazalo se da su grinje sira (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781.)) prikladan izvor hrane. Mali skokuni (npr. mlade jedinke *Folsomia candida* Willem, 1902. ili Onychiurus *fimatus* (19), (20), enhitreji (npr. *Enchytraeus crypticus* Westheide i Graefe, 1992.) ili nematode (npr. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913.)) mogu isto tako biti prikladni (21). Preporučuje se pregledati hranu prije nego što se upotrijebi u ispitivanju. Vrsta i količina hrane moraju osigurati dobivanje odgovarajućeg broja mladih jedinki kako bi kriteriji valjanosti bili ispunjeni (stavak 6.). Pri odabiru plijena treba uzeti u obzir način djelovanja ispitivane kemikalije (npr. akaricid može biti toksičan i za grinje koje služe kao hrana; vidjeti stavak 26.).

26. Hranu treba davati *ad libitum* (tj. svaki put malu količinu (vrh lopatice)). U tu se svrhu može upotrijebiti i ekshaustor blage usisne moći kakav se predlaže u testu na skokunima ili fina četka. Obično je dovoljno dati hranu na početku ispitivanja te dva do tri puta tjedno. Ako se čini da je ispitivana tvar toksična za plijen, treba razmisliti o učestalijem hranjenju i/ili uporabi alternativnog izvora hrane.

Odabir ispitnih koncentracija

27. Prethodno znanje o toksičnosti ispitivane kemikalije, npr. iz istraživanja za određivanje raspona, trebalo bi pomoći u odabiru odgovarajućih ispitnih koncentracija. Ako je potrebno, provodi se ispitivanje za određivanje raspona, i to s pet koncentracija ispitivane kemikalije u rasponu od 0,1 do 1 000 mg / kg suhog tla, s najmanje jednim ponavljanjem za tretmane i kontrolu. Ispitivanje za određivanje raspona traje 14 dana, nakon čega se određuje smrtnost odraslih grinja i broj mladih jedinki. Raspon koncentracija za konačno ispitivanje potrebno je po mogućnosti odabrati tako da uključuje koncentracije koje utječu na broj mladih jedinki, ali ne i na preživljavanje majčinske generacije. Međutim, to ponekad nije moguće kod kemikalija koje izazivaju letalne i subletalne učinke pri skoro sličnim koncentracijama. Koncentracija s učinkom (npr. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) i raspon koncentracija u kojemu je učinak ispitivane kemikalije od interesa moraju biti obuhvaćeni koncentracijama koje su uključene u ispitivanje. Ekstrapolaciju znatno ispod najniže koncentracije koja utječe na ispitne organizme ili iznad najviše ispitane koncentracije trebalo bi provoditi samo u iznimnim slučajevima, koje je u izvješću potrebno detaljno obrazložiti.

Plan pokusa

Ispitivanje odnosa između doze i odgovora

28. Predlažu se tri plana ispitivanja na temelju preporuka proizašlih iz jednog drugog prstenastog ispitivanja (testa reproduktivne toksičnosti za enhitreje

▼M6

(22)). Opća prikladnost svih tih planova potvrđena je rezultatima validacije na *H. aculeifer*.

29. Kod određivanja raspona koncentracija potrebno je voditi računa o sljedećemu:

— Za određivanje vrijednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) potrebno je ispitati dvanaest koncentracija. Preporučuju se najmanje dva ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i šest kontrolnih ponavljanja. Interval između koncentracija može se razlikovati, tj. može iznositi 1,8 ili manje za raspon koncentracija za koji se očekuje da će izazvati učinak te više od 1,8 kod viših i nižih koncentracija.

— Za određivanje NOEC-a treba ispitati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 2,0.

— Kombinirani pristup omogućuje određivanje i NOEC-a i vrijednosti EC_x. Potrebno je upotrijebiti osam ispitnih koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman plus osam kontrola. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor koji nije veći od 1,8.

Granično ispitivanje

30. Ako se u ispitivanju za određivanje raspona ne uoče učinci pri najvećoj koncentraciji (tj. 1 000 mg / kg suhe mase tla), glavni test reproduktivne toksičnosti može se provesti kao granični test s ispitnom koncentracijom od 1 000 mg / kg suhe mase tla. Granično ispitivanje pruža mogućnost da se dokaže da su NOEC ili EC_{10} za razmnožavanje veći od granične koncentracije, uz minimalan broj grinja upotrijebljenih u ispitivanju. Potrebno je upotrijebiti osam ponavljanja i za tretirano i za kontrolu.

Trajanje ispitivanja i mjerenja

31. Potrebno je zabilježiti sve uočene razlike između ponašanja i morfologije grinja u kontroli i onih u tretiranim posudama.

32. Četrnaestog dana preživjele se grinje vade iz tla ekstrakcijom s pomoću topline/svjetlosti ili drugom primjerenom metodom (vidjeti Dodatak 5.). Mlade jedinke (tj. ličinke, protonimfe i deutonimfe) i odrasle jedinke prebrojavaju se odvojeno. Sve odrasle grinje koje nisu pronađene u ovoj fazi potrebno je evidentirati kao uginule, jer se pretpostavlja da su te grinje uginule i da su se raspale prije ocjenjivanja. Učinkovitost ekstrakcije mora se provjeriti jedanput ili dvaput godišnje u kontrolama koje sadržavaju poznat broj odraslih i mladih jedinki. Učinkovitost mora u prosjeku biti iznad 90 % zajedno za sve razvojne faze (vidjeti Dodatak 5.). Broj odraslih i broj mladih jedinki ne prilagođavaju se u ovisnosti o učinkovitosti.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

33. Informacije o statističkim metodama koje se mogu upotrijebiti za analizu rezultata ispitivanja navedene su u stavcima od 36. do 41. Osim toga, potrebno je služiti se OECD-ovim Dokumentom 54. pod naslovom „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (Trenutačni pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: smjernice za primjenu) (31).

34. Glavna krajnja točka ispitivanja jest reprodukcijska uspješnost, odnosno broj nastalih mladih jedinki po ispitnoj posudi (u koje je bilo uvedeno deset odraslih ženki). Statistička analiza zahtijeva izračunavanje aritmetičke

▼M6

sredine (X) i varijance (s^2) reprodukcijske uspješnosti po tretmanu i po kontroli. X i s^2 primjenjuju se za postupke ANOVA kao što su Studentov t-test, Dunnettov test ili Williamsov test, kao i za izračunavanje intervala pouzdanosti od 95 %.

Napomena: Ta je glavna krajnja točka jednaka plodnosti izmjerenoj tako da je broj živih mladih jedinki nastalih tijekom ispitivanja podijeljen s brojem roditeljskih ženki uvedenih na početku ispitivanja.

35. Broj preživjelih ženki u netretiranim kontrolama glavni je kriterij valjanosti te mora biti dokumentiran. Kao i kod ispitivanja za određivanje raspona, u završnom izvješću treba navesti i sve ostale znakove koji ukazuju na štetno djelovanje.

EC_x

36. Vrijednosti EC_x i njihove niže i više 95-postotne granice pouzdanosti za parametar opisan u stavku 34. izračunavaju se odgovarajućim statističkim metodama (npr. probit-analizom, logističkom ili Weibullovom funkcijom, modificiranom Spearman-Karberovom metodom ili jednostavnom interpolacijom). EC_x dobiva se tako da se u dobivenu jednadžbu uvrsti vrijednosti koja odgovara x postotku kontrolne srednje vrijednosti. Da bi se izračunao EC_{50} ili bilo koji drugi EC_x, srednje vrijednosti po tretmanu (X) potrebno je podvrgnuti regresijskoj analizi.

NOEC/LOEC

37. Ako se za određivanje NOEC-a/LOEC-a namjerava primijeniti statistička analiza, potrebni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Potrebno je primijeniti odgovarajuće statističke metode (u skladu s OECD-ovim Dokumentom 54. pod naslovom „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). Općenito, štetni učinci ispitivane tvari u usporedbi s kontrolom istražuju se jednosmjernim testiranjem hipoteze za $p \leq 0,05$. U sljedećim se stavcima navode primjeri.

38. Normalna distribucija podataka može se ispitati npr. Kolmogorov-Smirnovljevim testom prikladnosti, testom omjera raspona i standardne devijacije (R/s-test) ili Shapiro-Wilkovim testom, (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Za ispitivanje homogenosti varijance može se primijeniti Cochranov test, Leveneov test ili Bartlettov test (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Ako su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost varijance), može se provesti jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i potom testovi višestruke usporedbe. Kako bi se izračunalo postoje li značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrola i različitih koncentracija ispitivane tvari, mogu se primijeniti testovi višestruke usporedbe (npr. Dunnettov t-test) ili testovi trenda postupnim snižavanjem (npr. Williamsov test u slučaju monotonog odnosa između doze i odgovora) (preporučeni se test bira u skladu s OECD-ovim Dokumentom 54. pod naslovom „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application"). Inače, za određivanje NOEC-a i LOEC-a potrebno je primijeniti neparametarske metode (npr. Bonferronijev U-test prema Holmu ili Jonckheere-Terpstrin test trenda).

Granično ispitivanje

39. Ako je provedeno granično ispitivanje (usporedba kontrole i samo jednog tretmana) te su ispunjeni uvjeti koje zahtijevaju parametarski testovi (normalnost, homogenost), metrički odgovori mogu se ocijeniti Studentovim testom (t-test). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, može se primijeniti t-test nejednake varijance (Welchov t-test) ili neparametarski test, kao što je Mann-Whitheyjev U-test.

40. Da bi se odredile značajne razlike između kontrola (kontrola i kontrola s otapalom), ponavljanja svake kontrole mogu se testirati na način opisan za granično ispitivanje. Ako se tim testovima ne otkriju značajne razlike, sva

▼M6

ponavljanja kontrole i kontrole s otapalom mogu se združiti. U protivnom se svi tretmani moraju usporediti s kontrolom s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

41. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće podatke:

— *Ispitivana kemikalija*

— identitet ispitivane kemikalije, naziv, šarža, serija i CAS broj, čistoća,

— fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije (npr. log K_{ow}, topljivost u vodi, tlak pare, Henryjeva konstanta (H) i po mogućnosti informacije o sudbini ispitivane kemikalije u tlu).

— *Ispitni organizmi*

— identifikacija i dobavljač ispitnih organizama, opis uvjeta uzgoja,

— raspon starosti ispitnih organizama.

— *Uvjeti ispitivanja*

— opis plana i postupka pokusa,

— detalji o pripremi ispitnog tla; detaljna specifikacija ako je upotrijebljeno prirodno tlo (podrijetlo, povijest, granulometrijski sastav, pH-vrijednost, sadržaj organske tvari te, ako postoji, klasifikacija tla)

— maksimalan vodni kapacitet tla,

— opis metode primjene ispitivane kemikalije na tlo,

— pojedinosti o pomoćnim kemikalijama koje su upotrijebljene za primjenu ispitivane kemikalije,

— veličina ispitnih posuda i suha masa ispitnog tla po posudi,

— uvjeti ispitivanja: intenzitet svjetlosti, trajanje ciklusa svjetla i tame, temperatura,

— opis režima hranjenja, vrsta i količina hrane upotrijebljene u ispitivanju, datumi hranjenja,

— pH-vrijednost i sadržaj vode u tlu na početku i tijekom ispitivanja (u kontroli i svakom tretmanu)

— detaljan opis ekstrakcijske metode i ekstrakcijska učinkovitost.

— *Rezultati ispitivanja*

— broj mladih jedinki utvrđen u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja,

— broj odraslih ženki i smrtnost odraslih jedinki (%) u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja,

— opis očitih simptoma ili jasnih promjena ponašanja,

— rezultati dobiveni s referentnom ispitivanom kemikalijom,

— sažeti statistički podaci (EC_x i/ili NOEC), uključujući 95-postotne granice pouzdanosti i opis metode izračuna,

▼M6

— grafički prikaz odnosa između koncentracije i odgovora,

— odstupanja od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave tijekom ispitivanja.

LITERATURA

(1) Casanueva, M. E. (1993.) Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21 – 46.

(2) Tenorio, J. M. (1982.) Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259 – 274.

(3) Bakker, F. M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. i van Stratum, P. (2003.) A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73 – 77.

(4) Karg, W. (1993.) Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. izdanje U: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, str. 523.

(5) Ruf, A. (1991.) Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). U: F. Dusbabek i V. Bukva (ur.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487 – 492

(6) Ruf, A. (1995.) Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883.) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: str. 241. – 249.

(7) Ruf, A. (1996.) Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994., Columbus, Ohio: str. 621. – 628.

(8) Krogh, P. H. i Axelsen, J. A. (1998.) Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. U: Lokke, H. i van Gestel, C. A. M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, str. 239. – 251.

(9) Løkke, H., Janssen, C. R., Lanno, R. P., Römbke, J., Rundgren, S. i van Straalen, N. M. (2002.) Soil Toxicity Tests – Invertebrates. U: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., van Straalen, N. M. i Tarazona, J. V. (ur.). SETAC Press, Pensacola, SAD. str. 128.

(10) Schlosser, H.-J. i Riepert, F. (1991./1992.) Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883. (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395 – 433.

(11) Schlosser, H.-J. i Riepert, F. (1992.) Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N. F. 34, 413 – 433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. i Krogh, P. H. (2005.) Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154 – 7157.

(13) Petersen, H. (1978.) Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95 – 122.

(14) ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Ženeva.

▼M6

(15) Poglavlje C.8. ovog Priloga – Toksičnost za gujavice.

(16) EPPO (2003.): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195 – 209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993.) Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Ženeva.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P. W., van Straalen, N. M. i Tarazona, J. V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, SAD.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H. J. i Riepert, F. (1992.) Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool. Beitr. N. F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. i Krogh, P. H. (2007.) Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Poglavlje C.32 ovoga Priloga – Test reproduktivne toksičnosti na erhitrejama.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994.) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Ženeva.

(24) Southwood, T. R. E. (1991.) Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (drugo izdanje). Chapman & Hall, London, str. 524.

(25) Dunger, W. i Fiedler, H. J. (1997.) Methoden der Bodenbiologie (drugo izdanje). G. Fischer, Jena, str. 539.

(26) Lesna, I. i Sabelis, M. W. (1999.) Diet-dependent female choice for males with „good genes" in a soil predatory mite. Nature 401, 581 – 583.

(27) Ruf, A. (1989.) Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883.) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103 – 107.

(28) Ruf, A. (1993.) Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883.) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974.) Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11 – 59.

(30) Kevan, D. K. McE. i Sharma, G. D. (1964.) Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006.c) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode primjenjuju se sljedeće definicije (u ovom se ispitivanju sve koncentracije s učinkom izražavaju kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla):

Kemikalija je tvar ili smjesa.

NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka) je koncentracija ispitivane kemikalije kod koje nije uočen nikakav učinak. Kod ovog ispitivanja koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar određenog razdoblja izloženosti u usporedbi s kontrolom.

LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom) je najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja ima statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar određenog razdoblja izloženosti u usporedbi s kontrolom.

EC_x (koncentracija s učinkom od x %) je koncentracija koja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u određenom razdoblju izloženosti u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da proizvodi učinak na ispitivani parametar kod 50 % izložene populacije u definiranom razdoblju izloženosti.

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

▼**M6**

Dodatak 2.

Određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta tla

Sljedeća metoda određivanja maksimalnog vodnog kapaciteta tla smatra se primjerenom. Opisana je u Prilogu C normi ISO DIS 11268-2 (Kakvoća tla – Učinci onečišćivača na gujavice (*Eisenia fetida*). Dio 2.: Određivanje učinaka na razmnožavanje (23))

Odgovarajućom napravom (npr. svrdlom s epruvetom) uzme se određena količina (npr. 5 g) tla koje služi kao ispitni supstrat. Dno epruvete prekrije se komadom filtarskog papira, epruveta se napuni vodom te postavi na stalak u vodenoj kupelji. Epruvetu je potrebno postupno uranjati sve dok razina vode ne bude iznad gornjeg dijela tla. Potom je treba ostaviti u vodi oko tri sata. Budući da tlo ne može zadržati svu vodu koju apsorbira kapilarama, uzorak tla potrebno je ostaviti dva sata da se ocijedi tako što se epruveta postavi na podlogu od vrlo mokrog, fino usitnjenog kremenog pijeska u zatvorenoj posudi (da se spriječi sušenje). Uzorak je potom potrebno izvagati i osušiti do stalne mase na 105 °C. Vodni kapacitet (WHC) potom se može izračunati kako slijedi:

$$\mathrm{WHC(u\ postotku\ suhe\ mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdje je:

S = supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filtarskog papira,

T = tara (masa epruvete + masa filtarskog papira),

D = suha masa supstrata.

▼**M6**

Dodatak 3.

Određivanje pH-vrijednosti tla

Sljedeća metoda za određivanje pH-vrijednosti tla temelji se na opisu navedenom u normi ISO DIS 10390: Kakvoća tla – Određivanje pH-vrijednosti (16).

Definirana količina tla suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Potom se tlo (najmanje 5 grama) suspendira u pet puta većoj količini 1 M otopine kalijeva klorida (KCl) analitičkog stupnja čistoće ili 0,01 M otopine kalcijeva klorida ($CaCl_2$) analitičkog stupnja čistoće. Suspenzija se potom temeljito protresa pet minuta te se ostavi da se taloži najmanje dva sata, ali ne dulje od 24 sata. Potom se pH-vrijednost tekuće faze izmjeri pH-metrom koji se prije svakog mjerenja kalibrira s pomoću odgovarajućeg niza puferskih otopina (npr. pH 4,0 i 7,0).

▼M6

Dodatak 4.

Uzgoj *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* i grinja za hranu te sinkronizacija kulture

Uzgoj *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Kulture se mogu održavati u plastičnim posudama ili staklenkama napunjenima smjesom modelarskog gipsa i drvenog ugljena u prahu (9: 1). Prema potrebi, gips se može održavati mokrim dodavanjem nekoliko kapi destilirane ili deionizirane. Optimalna temperatura uzgoja iznosi 20 ± 2 °C, a režim izmjene svjetla i tame nije relevantan za ovu vrstu. Plijen mogu biti grinje *Typrophagus putrescentiae* ili *Caloglyphus* sp. (grinjama za hranu potrebno je rukovati pažljivo jer mogu izazvati alergije kod ljudi), ali i nematode, enhitreje i skokuni mogu biti prikladan plijen. Potrebno je evidentirati njihov izvor. Razvoj populacije može se započeti s jednom ženkom, jer se mužjaci razvijaju u neoplođenim jajašcima. Generacije se u velikoj mjeri preklapaju. Ženka može živjeti najmanje 100 dana i tijekom života može položiti oko 100 jajašaca. Maksimalna ovipozicija postiže se između 10. i 40. dana (u odrasloj dobi) i iznosi do 2,2 jaja/ženka^{-1}/dan^{-1}. Vrijeme razvoja od jajašca do odrasle ženke iznosi oko 20 dana na 20 °C. Potrebno je unaprijed uzgojiti i održavati više od jedne kulture.

Uzgoj *Typrophagus putrescentiae*:

Grinje se drže u staklenoj posudi napunjenoj pivskim kvascem u prahu, koja se stavlja u plastičnu kantu napunjenu otopinom KNO_3 kako bi se spriječio bijeg životinja. Grinje za hranu stavljaju se na prah. Nakon toga lopaticom se pažljivo pomiješaju s prahom (koji se mora zamijeniti dvaput tjedno).

Sinkronizacija kulture:

Jedinke koje se upotrebljavaju u ispitivanju moraju biti slične dobi (otprilike sedam dana nakon što su postale odrasle). Pri temperaturi uzgoja od 20 °C to se postiže na sljedeći način:

Ženke se prenesu u čistu uzgojnu posudu u koju se doda dovoljno hrane.

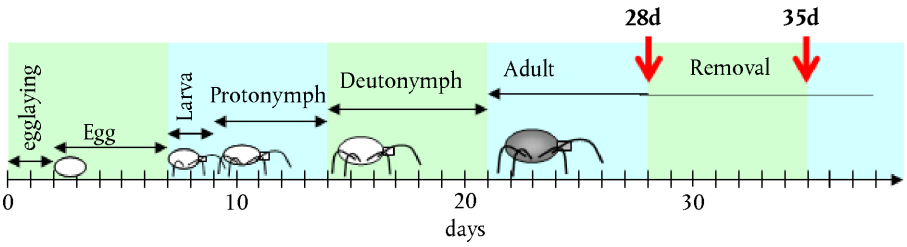
— Ostavi ih se dva do tri dana da polažu jajašca i potom se uklone.

— Odrasle se ženke uzimaju za ispitivanje između 28. i 35. dana nakon što su odrasle ženke bile stavljene u čiste uzgojne posude.

Odrasle je ženke lako razlikovati od mužjaka i životinja u drugim razvojnim fazama po tome što su veće, napuhnutog su oblika i leđni im je štit smeđe boje (mužjaci su tanji i plosnatog su oblika), dok su nedorasle jedinke bijele do krem boje. Pri temperaturi od 20 °C grinje se razvijaju otprilike prema obrascu opisanom u nastavku (slika): jaja se razvijaju pet dana, ličinka dva dana, protonimfa pet dana, deutonimfa sedam dana, a razdoblje je predovipozicije ženki dva dana. Grinje su nakon toga odrasle.

Slika

Razvoj *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* na 20 °C. (uklanjanje = ženke koje se upotrebljavaju za ispitivanje)



▼**M6**

Odrasle ispitne životinje uklanjaju se iz sinkronizirane kulture i stavljaju u ispitne posude između 28. i 35. dana nakon što su roditeljske ženke počele polagati jajašca (tj. sedam do 14 dana nakon što su postale odrasle). Time se osigurava da su ispitne životinje već prošle kroz razdoblje predovipozicije i parile su se s mužjacima koji su isto tako prisutni u posudi za uzgoj. Promatranjima laboratorijskih kultura došlo se do zaključka da se u prisutnosti mužjaka ženke pare odmah ili brzo nakon što postanu odrasle (Ruf, Vaninnen, osobna opažanja). Razdoblje od sedam dana odabrano je radi lakšeg uključivanja u laboratorijsku rutinu i ublažavanja pojedinačnih razlika u razviju grinja. Ovipoziciju potrebno je započeti s barem onoliko ženki koliko će ih na kraju biti potrebno za ispitivanje (ako je za ispitivanje potrebno primjerice 400 ženki, najmanje 400 ženki potrebno je ostaviti da polažu jajašca dva do tri dana). Kao polazište za sinkroniziranu populaciju potrebno je najmanje 1 200 jajašaca (omjer spolova oko 0,5, smrtnost oko 0,2). Kako bi se spriječio kanibalizam, poželjno je da u jednoj posudi ne bude više od 20 do 30 ženki koje su u fazi ovipozicije.

▼M6

Dodatak 5.

Metode ekstrakcije

Za mikroartropode ekstrakcija toplinom primjerena je metoda odvajanja jedinki od tla/supstrata (vidi sliku u nastavku). Metoda se temelji na aktivnosti organizama pa će tako samo pokretne jedinke imati priliku biti zabilježene. Načelo ekstrakcije toplinom jest da se organizmima u uzorku postupno pogoršavaju uvjeti i time ih se potakne da napuste supstrat i upadnu u tekućinu za fiksiranje (npr. etanol). Ključne su točke trajanje ekstrakcije i stupnjevita promjena uvjeta koji će prvo biti dobri, potom osrednji, a na kraju loši za organizme. Ekstrakcija za ekotoksikološka ispitivanja mora trajati što je moguće kraće jer će svaki rast populacije tijekom ekstrakcije dovesti do pogrešnih rezultata. S druge strane, temperatura i vlaga u uzorku moraju uvijek biti u rasponu koji omogućuje kretanje grinja. Grijanje uzorka tla dovodi do isušivanja supstrata. Ako do isušivanja dođe prebrzo, i neke bi se grinje mogle isušiti prije nego što uspiju pobjeći.

Stoga se predlaže sljedeći postupak (24) (25):

Oprema: Tullgrenov lijevak ili usporedive metode kao što je npr. McFadyenova metoda (grijanje odozgo, uzorak se postavlja na lijevak)

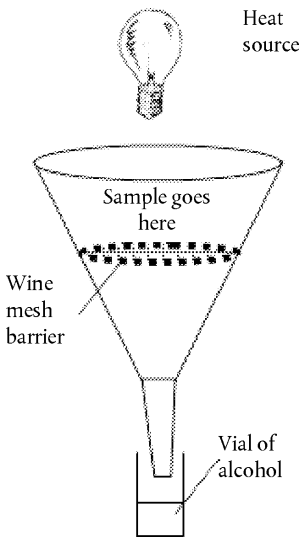
Režim grijanja: 25 °C tijekom 12 sati, 35 °C tijekom 12 sati, 45 °C tijekom 24 sata (ukupno 48 sati). Temperaturu je potrebno mjeriti u supstratu.

Tekućina za fiksiranje: 70-postotni etanol

Detaljan opis: Uzmite staklenu bočicu koja je upotrijebljena za ispitivanje. Uklonite poklopac i otvor zatvorite bočicu komadom mrežice ili tkanine. Tkanina mora imati rupice veličine 1,0 do 1,5 mm. Učvrstite tkaninu gumicom. Pažljivo okrenite bočicu naopako i postavite je u napravu za ekstrakciju. Tkanina sprječava kapanje supstrata u tekućinu za fiksiranje, ali omogućuje grinjama da napuste uzorak. Nakon što postavite sve bočice, započnite režim grijanja. Ekstrakciju završite nakon 48 sati. Uklonite bočice za fiksiranje i prebrojite grinje s pomoću disekcijskog mikroskopa.

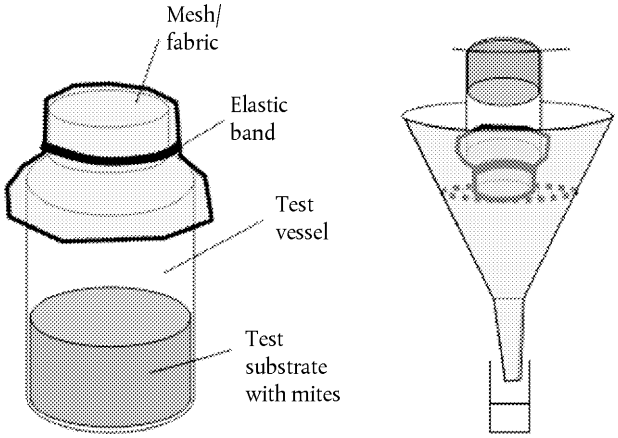
Ekstrakcijska učinkovitost odabrane metode mora se dokazati jednom ili dvaput godišnje uporabom posuda koje sadržavaju poznat broj mladih i odraslih grinja u netretiranom ispitnom supstratu. Učinkovitost mora u prosjeku biti iznad 90 % zajedno za sve razvojne faze.

Ekstrakcijska naprava tipa Tullgren



▼**M6**

Kako pripremiti ispitnu bočicu nakon završenog ispitivanja, a prije ekstrakcije.



▼**M6**

Dodatak 6.

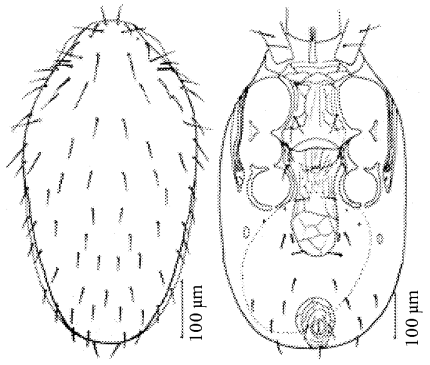
Identifikacija *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podrazred/red/podred:	Porodica:	Rod/podrod/vrsta:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

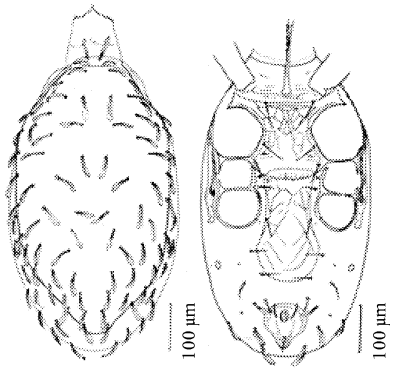
Autor i datum:	dr. sc. F. Faraji, (MITOX), 23. siječnja 2007.

Upotrijebljena literatura:	Karg, W. (1993.) Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2. revidirano izdanje: 1 – 523. Hughes, A. M. (1976.) The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: str. 400. Krantz, G. W. (1978.) A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., str. 509.

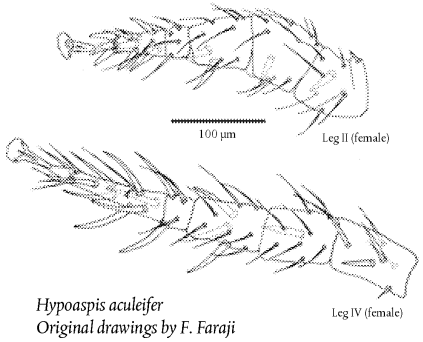
Odredbene značajke:	Tektum sa zaobljenim nazubljenim rubom; hipostomske brazde s više od šest zubića; kaudalne dorzalne dlake Z4 nisu previše duge; dorzalne dlake čekinjaste; genitalni štit normalan, ne previše povećan i ne doseže do analnog štita; stražnja polovica dorzalnog štita bez neparnih dlaka; noge II. i IV. s nekoliko debljih makrodlaka; dorzalne dlake Z5 oko dva puta dulje od J5; fiksni članak kliješta (helicera) s 12 do 14 zubi i pokretni članak s dva zuba; Idiosoma duga 520 do 685 µm. Grinje *Hypoaspis miles* upotrebljavaju se i za biološko suzbijanje štetnika te ih se može brkati s grinjama *H. aculeifer*. Razlikuju se u sljedećem: *H. miles* pripada podrodu *Cosmolaelaps* i dorzalne su joj dlake u obliku noža, dok *H. aculeifer* pripada podrodu *Geolaelaps* i ima čekinjaste dorzalne dlake.



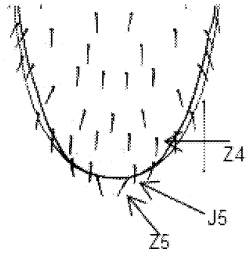
Hypoaspis aculeifer After Hughes, 1976



Hypoaspis miles After Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Original drawings by F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorsal shield with characteristic setae

▼M6

Dodatak 7.

Osnovne informacije o biologiji grinja *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Grinje *Hypoaspis aculeifer* pripadaju porodici Lealapidae, redu Acari (grinje), razredu Arachnida, koljenu Arthropoda. Žive u svim vrstama tla i hrane se drugim grinjama, nematodama, enhitrejama i skokunima (26). U nedostatku hrane prelaze na kanibalizam (27). Tijelo grabežljive grinje segmentirano je na idiosomu i gnatosomu. Idiosoma nije jasno podijeljena na prosomu (glavu) i opistosomu (stražnje tijelo). Gnatosoma (vratni štit) sadržava dijelove tijela koji služe za hranjenje, kao što su pipala i kliješta. Kliješta se granaju u tri dijela i na njima se nalaze zubi različitih oblika. Osim što ih upotrebljavaju za uzimanje hrane, mužjaci se koriste kliještima uglavnom kako bi na ženke prenijeli spermatofore. Dorzalni štit prekriva skoro čitavu idiosomu. Kod ženki velik dio idiosome zauzimaju reproduktivni organi, koji se posebno ističu nedugo prije polaganja jajašaca. Ventralno se nalaze dva štita, sternalni i genitalni. Na svim se nogama nalaze oštre dlake i bodlje. Oštre dlake služe im za pričvršćivanje dok se kreću kroz tlo ili po površini tla. Prvi par nogu uglavnom služi kao osjetilo. Drugi par nogu ne služi samo za kretanje, nego i za hvatanje plijena. Bodlje na četvrtom paru nogu mogu služiti za zaštitu i kao „motor za kretanje” (28). Mužjaci su dugi 0,55 do 0,65 mm i teški 10 do 15 µg. Ženke su duge 0,8 do 0,9 mm i teške 50 do 60 µg (8) (28) (Slika 1.).

Slika 1.

Ženka, mužjak, protonimfa i ličinka grinje *H. aculeifer*.



Pri temperaturi od 23 °C grinje postaju spolno zrele nakon 16 dana (ženke) odnosno18 dana (mužjaci) (6). Ženke prihvaćaju spermije preko spolnog otvora (solenostoma), odakle se prenose u jajnik. U jajniku spermiji dozrijevaju i odlažu se. Do oplodnje dolazi tek nakon što spermiji dozriju u jajniku. Ženke polažu oplođena ili neoplođena jaja u hrpicama ili odvojeno, najčešće u pukotine ili rupe. Ženke koje su kopulirale mogu nositi mlade obaju spolova, ali iz jaja ženki koje nisu kopulirale mogu se razviti samo jedinke muškog spola. Tijekom razvoja do odrasle dobi grinje prolaze kroz četiri razvojne faze (jaje – ličinka, ličinka – protonimfa, protonimfa – deutonimfa, deutonimfa – odrasla grinja).

Jaje je mliječno bijele boje, staklasto prozirno i eliptičnog oblika, dugo je oko 0,37 mm te ima čvrstu ljusku. Prema (8), ličinke su velike između 0,42 i 0,45 mm. Imaju samo tri para nogu. U području glave razvijena su pipala i kliješta. Kliješta, koja imaju tek nekoliko malih zubića, služe za izlijeganje iz jajeta. Nakon prvog presvlačenja, jedan do dva dana nakon izlijeganja, razvijaju se protonimfe. One su također bijele, velike su 0,45 do 0,62 mm (8) te imaju četiri para nogu. Na kliještima su prisutni kompletni zubi. Počevši od ove faze

▼**M6**

grinje počinju tražiti hranu. U tu svrhu kliještima probijaju kutikulu plijena i u plijen ispuštaju izlučevinu koja omogućuje izvanželučanu probavu. Grinja potom može usisati takvu kašastu hranu. Kliješta mogu služiti i za trganje većih čestica iz grumenaste hrane (28). Nakon još jednog presvlačenja razvijaju se deutonimfe. Velike su 0,60 do 0,80 mm (8) i žute do svjetlosmeđe boje. Počevši od te faze mogu se odvojiti na ženke i mužjake. Nakon još jednog presvlačenja, tijekom kojeg su životinje neaktivne i razvija im se smeđi štiti (otprilike nakon 14 dana), grinje postaju odrasle (28) (29) (30). Životni vijek im je između 48 i 100 dana na 25 °C (27).

▼**M6**

Dodatak 8.

Sažeti prikaz i vremenski raspored glavnih aktivnosti koje je potrebno poduzeti pri provođenju ispitivanja na vrsti *Hypoaspis*

Vrijeme (dani) početak ispitivanja = dan 0.	Aktivnost/zadaća
Dan –35. do –28.	Prenijeti ženke iz radne kulture u čiste posude kako bi se započelo sa sinkronizacijom Dva dana poslije: uklanjanje ženki Dva ili tri puta tjedno: dodati dovoljnu količinu hrane
Dan –5. (+/– 2)	Pripremiti umjetno tlo
Dan –4. (+/– 2)	Odrediti WHC umjetnog tla Sušiti preko noći Sljedeći dan: izvagati uzorke te izračunati WHC
Dan –4. (+/– 2)	Prethodno navlažiti umjetno tlo da se postigne 20 do 30 % WHC-a
Dan 0.	Započeti ispitivanje: dodati ispitivanu kemikaliju u umjetno tlo U svaku posudu unijeti deset ženki Izvagati svaku posudu Pripremiti abiotičke kontrole za mjerenje sadržaja vlage i pH-vrijednosti, dva ponavljanja za svaki tretman Preko noći sušiti kontrole za mjerenje vlage Sljedeći dan: izvagati kontrole za mjerenje vlage Sljedeći dan: izmjeriti pH osušenih abiotičkih kontrola
Dan 3., 6., 9. i 12. (otprilike)	U svaku posudu unijeti dovoljnu količinu organizama koji će služiti kao plijen Izvagati svaku posudu i prema potrebi dodati isparenu vodu
Dan 14.	Završiti ispitivanje, započeti ekstrakciju iz svih posuda i pripremiti kontrole za određivanje učinkovitosti ekstrakcije Preko noći sušiti kontrole za mjerenje sadržaja vode Sljedeći dan: izvagati kontrole za mjerenje sadržaja vode Sljedeći dan: izmjeriti pH osušenih kontrola
Dan 16.	Završiti ekstrakciju
Dan 16.+	Zabilježiti broj odraslih i mladih jedinki u ekstrahiranom materijalu Upisati rezultate u tablične obrasce Upisati ispitni postupak u obrasce protokola ispitivanja.

▼M6

C.37. 21-DNEVNI TEST NA RIBAMA: KRATKOROČNI TEST PROBIRA NA ESTROGENSKU I ANDROGENSKU AKTIVNOST I INHIBICIJU AROMATAZE

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a TG 230 (2009.). Potreba za razvojem i potvrdom testa na ribama s pomoću kojeg je moguće otkriti određene endokrino aktivne kemikalije pojavila se zbog zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu štetno utjecati na ljude i životinje zbog interakcije tih kemikalija i endokrinog sustava. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta radi revizije postojećih smjernica te razvoja novih smjernica za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora. Jedan element te aktivnosti bio je razvoj Smjernice za test probira kemikalija koje djeluju na endokrini sustav riba. 21-dnevni test probira endokrino aktivnih tvari na ribama podvrgnut je opsežnom programu validacije koji je uključivao međulaboratorijske studije s odabranim kemikalijama za dokazivanje relevantnosti i pouzdanosti testa u svrhu otkrivanja kemikalija inhibitora aromataze i estrogena (1, 2, 3, 4, 5) u trima ispitivanima ribljim vrstama (debeloglava gavčica *Pimephales promelas*, medaka *Oryzias latipes* i zebrica *Danio rerio*). Otkrivanje androgenske aktivnosti moguće je u debeloglave gavčice i medake, ali ne i u zebrice. Ovom ispitnom metodom nije moguće otkrivanje antiandrogenskih kemikalija. Vijeće stručnjaka koje su imenovali nacionalni koordinatori programa Smjernice za ispitivanje (6) stručno je ocijenilo validaciju. Test nije namijenjen za identifikaciju određenih mehanizama hormonalnih poremećaja jer pokusne životinje imaju netaknutu os hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG) koja može reagirati na kemikalije koje na nju utječu na različitim razinama. Kratkoročni reprodukcijski test na ribama (OECD-ova smjernica za ispitivanje TG 229) uključuje plodnost te, ovisno o slučaju, histopatologiju gonada debeloglave gavčice te sve krajnje učinke uključene u tu ispitnu metodu. OECD-ovom smjernicom za ispitivanje TG 229 predviđen je probir kemikalija koje različitim mehanizmima, uključujući endokrine modalitete, utječu na reprodukciju. To je potrebno uzeti u obzir prije odabira najprimjerenije ispitne metode.

2. Ovom se ispitnom metodom opisuje test probira *in vivo* pri čemu su spolno zreli mužjak i ženka u mrijestu zajedno izloženi kemikaliji tijekom ograničenog dijela životnog ciklusa (21 dan). Po završetku 21-dnevnog razdoblja izlaganja, ovisno o upotrijebljenoj vrsti, u mužjakâ i ženki mjeri se jedan ili dva krajnja učinka biomarkera kao pokazatelji estrogenske ili androgenske aktivnosti i inhibicije aromataze ispitivane kemikalije, a ti su krajnji učinci vitelogenin i sekundarna spolna obilježja. Vitelogenin se mjeri u debeloglave gavčice, medake i zebrice, a sekundarna spolna obilježja mjere se samo u debeloglave gavčice i medake.

3. Ovaj biotest služi kao test probira *in vivo* za određene endokrine načine djelovanja, a njegova primjena trebala bi se promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (28).

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Vitelogenin u pravilu nastaje u jetri ženki kralježnjaka koje liježu jaja kao reakcija na cirkuliranje endogenog estrogena. Riječ je o prekursoru proteina u žumanjku koji, nakon nastanka u jetri, putuje krvotokom do jajnika, gdje ga preuzimaju i modificiraju jajašca u razvoju. Vitelogenin je gotovo nemoguće otkriti u plazmi nezrelih ženki i mužjaka riba zbog manjka estrogena u optoku; međutim, jetra je sposobna za sintezu i izlučivanje vitelogenina kao reakciju na egzogenu estrogensku simulaciju.

▼**M6**

5. Mjerenje vitelogenina namijenjeno je za otkrivanje kemikalija s različitim estrogenskim načinima djelovanja. Otkrivanje estrogenskih kemikalija moguće je mjerenjem indukcije vitelogenina u mužjaka riba te je opširno dokumentirano u stručno recenziranoj znanstvenoj literaturi (primjerice (7)). Indukcija vitelogenina dokazana je i nakon izlaganja aromatizirajućim androgenima (8, 9). Pad razine estrogena u optoku ženki, primjerice inhibicijom aromataze kojom se endogeni androgen pretvara u prirodni estrogen 17β-estradiol, uzrok je pada razine vitelogenina koji se upotrebljava za otkrivanje kemikalija sa svojstvima inhibicije aromataze (10, 11). Biološka važnost reakcije vitelogenina nakon estrogenske inhibicije / inhibicije aromataze utvrđena je i opširno dokumentirana. Međutim, moguće je da na nastajanje vitelogenina u ženki utječu i opća toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, primjerice hepatotoksičnost.

6. Za uobičajenu je upotrebu razvijeno i standardizirano nekoliko metoda mjerenja. Riječ je o metodama imunoenzimskog testa (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) specifičnima za pojedinu vrstu, kod kojih se imunokemija upotrebljava za kvantifikaciju vitelogenina nastalog u malim uzorcima krvi ili jetre prikupljenima od pojedinačnih riba (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). U svrhu mjerenja vitelogenina uzeti su uzorci krvi debeloglave gavčice i zebrice ili uzorci homogenata s glave/repa te uzorci jetre medake. U medake postoji dobra korelacija između vitelogenina izmjerenog u krvi i u jetri (19). U Dodatku 6. navedeni su preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu vitelogenina. Kompleti za mjerenje vitelogenina široko su dostupni, a trebali bi se temeljiti na potvrđenoj metodi ELISA specifičnoj za pojedinu vrstu.

7. Sekundarna spolna obilježja mužjaka određenih ribljih vrsta izvana su vidljiva, može ih se kvantificirati te reagiraju na razine endogenih androgena u optoku; to je tako u slučaju debeloglave gavčice i medake, ali ne i zebrice, koja nema sekundarna spolna obilježja koja se mogu kvantificirati. Ženke zadržavaju sposobnost razvoja muških sekundarnih spolnih obilježja u slučaju izlaganja androgenim kemikalijama u vodi. U stručnoj literaturi dostupno je nekoliko studija u kojima je dokumentirana ta vrsta reakcije u debeloglave gavčice (20) i medake (21). Smanjenje sekundarnih spolnih obilježja u mužjaka potrebno je oprezno tumačiti zbog slabe statističke snage te je tumačenje potrebno temeljiti na stručnoj procjeni i težini dokaza. Postoje ograničenja u upotrebi zebrica u ovom testu zbog izostanka mjerljivih sekundarnih spolnih obilježja koja reagiraju na kemikalije s androgenim djelovanjem.

8. U debeloglave gavčice glavni je pokazatelj egzogene androgene izloženosti broj izraslina na ustima spolno zrele ženke ribe. U medake broj papilarnih procesa glavni je pokazatelj egzogene izloženosti androgenim kemikalijama ženki riba. U dodacima 5.A i 5.B navedeni su preporučeni postupci za procjenu spolnih obilježja u debeloglave gavčice, odnosno medake.

9. Definicije upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Tijekom testa mužjaci i ženke riba u reproduktivnom statusu zajednički se izlažu u ispitnim posudama. Zahvaljujući njihovu odraslom i reproduktivnom statusu moguće je jasno razlikovanje spolova, a time i analiza svakog krajnjeg učinka koja se odnosi na spol te se osigurava njihova osjetljivost na egzogene kemikalije. Po završetku ispitivanja spol se potvrđuje makroskopskim pregledom gonada nakon otvaranja trbuha s pomoću škara. U Dodatku 2. naveden je pregled relevantnih uvjeta biotesta. Test u

▼M6

pravilu počinje uzimanjem uzorka riba iz populacije u mrijestu, a upotreba starih životinja nije dopuštena. Smjernice o starosti riba i reproduktivnom statusu navedene su u odjeljku o odabiru riba. Test se provodi s pomoću triju koncentracija izloženosti kemikaliji i kontrolnoj skupini s vodom i, po potrebi, kontrolnoj skupini s otapalom. Upotrebljavaju se dvije posude po tretiranoj skupini ili replike (u svakoj se posudi nalazi pet mužjaka i pet ženki) u slučaju medaka i zebrica, a u slučaju debeloglave gavčice četiri posude ili replike (u svakoj se posudi nalaze dva mužjaka i četiri ženke). Razlog za to je zadovoljavanje teritorijalnog ponašanja mužjaka debeloglave gavčice uz zadržavanje dostatne snage testa. Razdoblje izlaganja traje 21 dan, a uzorkovanje riba obavlja se dvadeset prvog dana.

11. Pri uzorkovanju 21. dana sve se životinje usmrćuju na humani način. Sekundarna spolna obilježja mjere se u debeloglave gavčice i medake (vidjeti dodatke 5.A i 5.B), uzorci krvi uzimaju se radi utvrđivanja vitelogenina u zebrice i debeloglave gavčice, a osim toga, za utvrđivanje vitelogenina u zebrice može se uzeti glava / rep (Dodatak 6.), dok se za analizu vitelogenina u medake uzima jetra (Dodatak 6.)

KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ISPITIVANJA

12. Za prihvatljivost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— smrtnost u kontrolnim skupinama s vodom (ili otapalom) ne smije premašiti 10 % na kraju razdoblja izlaganja;

— tijekom razdoblja izlaganja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenja kisikom (engl. *air saturation value*, ASV);

— razlike u temperaturi vode među ispitnim posudama ne bi ni u jednom trenutku tijekom razdoblja izlaganja trebale biti veće od ± 1,5 °C, a temperaturu vode potrebno je održavati unutar raspona od 2 °C unutar temperaturnih raspona za pokusne vrste (Dodatak 2.);

— trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini zadovoljavajuće kretale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

OPIS METODE

Oprema

13. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

(a) mjerači kisika i pH vrijednosti;

(b) oprema za određivanje tvrdoće i lužnatosti vode;

(c) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje;

(d) akvariji izrađeni od kemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeni prostor za određeni broj riba (vidi Dodatak 2.)

(e) supstrat za mrijest debeloglave gavčice i zebrice (potrebni podaci navedeni su u Dodatku 4.)

(f) vaga prikladne točnosti (odnosno točnost u rasponu od ± 0,5 mg).

▼M6

Voda

14. Kao ispitna voda može se upotrijebiti svaka voda koja je prikladna za dugoročno preživljavanje i rast pokusne vrste. Tijekom razdoblja ispitivanja kvaliteta vode treba biti stalna. pH-vrijednost vode trebala bi biti u rasponu od 6,5 do 8,5, ali tijekom predmetnog ispitivanja trebala bi biti u rasponu od ± 0,5 pH jedinica. Uzorke za analizu potrebno je uzimati u intervalima kako bi se osiguralo da voda za razrjeđivanje ne utječe pretjerano na rezultate ispitivanja (primjerice kombinacijom s ispitivanom kemikalijom). Mjerenja teških metala (primjerice Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih aniona i kationa (primjerice Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i $SO4^{2-}$), pesticida (primjerice ukupnih organofosfornih i ukupnih organoklorovih pesticida), ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari potrebno je obavljati, primjerice, svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kvalitete. Ako se dokaže da je kvaliteta vode stalna tijekom najmanje jedne godine, mjerenja se mogu prorijediti i intervali produljiti (primjerice svakih šest mjeseci). Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 3.

Ispitne otopine

15. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem radne otopine. Radnu otopinu potrebno je po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (primjerice mješačem ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije radne otopine mogu se upotrebljavati kolone za zasićivanje („kolone za topljivost”). Upotreba pomoćnog otapala ne preporučuje se. Međutim, ako je potrebno otapalo, istovremeno je potrebno primijeniti i kontrolnu skupinu za otapalo u jednakoj koncentraciji kao i onoj upotrijebljenoj u skupinama tretiranima kemikalijom. Za složene ispitivane kemikalije otapalo je, u tehničkom smislu, najbolje rješenje, a potrebno je pročitati OECD-ovu Smjernicu o ispitivanju toksičnosti za vodu složenih tvari i smjesa (22). Odabir otapala bit će određen kemijskim svojstvima kemikalije. U OECD-ovoj smjernici preporučuje se najveća vrijednost od 100 µl/l, što je potrebno poštovati. Međutim, nedavnom su revizijom (23) naglašene dodatne dvojbe pri upotrebi otapala za ispitivanje endokrine aktivnosti. Stoga se preporučuje da se koncentracija otapala, ako je otapalo potrebno, svede na najmanju moguću mjeru kad god je to tehnički izvedivo (ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije).

16. Za ispitivanje će se upotrijebiti protočni sustav. Tim se sustavom stalno ispušta i razrjeđuje radna otopina ispitivane kemikalije (primjerice pumpa za doziranje, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač) kako bi u ispitne komore pritjecao niz koncentracija. Brzine protoka radnih otopina i vode za razrjeđivanje tijekom ispitivanja potrebno je provjeravati u intervalima, po mogućnosti jedanput dnevno, i one za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Potrebno je paziti da se izbjegne upotreba nekvalitetnih plastičnih cijevi ili ostalih materijala koji mogu sadržavati biološki aktivne kemikalije. Pri odabiru materijala za protočni sustav potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane kemikalije na tom materijalu.

Držanje riba

17. Pokusne ribe potrebno je odabrati među laboratorijskom populacijom, a po mogućnosti i iz istog matičnog jata, koje je najmanje dva tjedna prije ispitivanja držano u uvjetima koji su slični ispitnim uvjetima u smislu kvalitete vode i osvjetljenja. Važno je da se osigura dovoljan prostor tj. veličina akvarija koja za zadani broj odnosno masu riba (za definicije vidi Dodatak 1.) odgovara upotrijebljenoj pokusnoj vrsti (vidi Dodatak 2.).

18. Nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati bilježi se smrtnost uz primjenu sljedećih kriterija:

▼M6

— smrtnost veća od 10 % populacije u sedam dana: odbacuje se čitava serija,

— smrtnost između 5 i 10 % populacije: prilagodba još sedam dana; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, čitava se serija odbacuje,

— smrtnost manje od 5 % populacije u sedam dana: serija se prihvaća.

19. Ribe se ne smije liječiti tijekom razdoblja prilagodbe, razdoblja prije izlaganja ili tijekom razdoblja izlaganja.

Razdoblje prije izlaganja i odabir riba

20. Preporučuje se jednotjedno razdoblje prije izlaganja, pri čemu se životinje smještaju u posude slične pokusnima. Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* tijekom razdoblja držanja i faze izlaganja. Faza izlaganja započinje spolno dimorfnom odraslom ribom iz laboratorijske skupine reproduktivno zrelih životinja (primjerice s jasno vidljivim sekundarnim spolnim obilježjima kad je riječ o debeloglavoj gavčici i medaki) koja je u aktivnom mrijestu. Prema općim smjernicama (koje se uzima u obzir uz promatranje stvarnog reproduktivnog statusa predmetne serije riba) debeloglave gavčice trebale bi biti stare približno 20 (± 2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ± 2 °C. Medake bi trebale biti stare približno 16 (± 2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ± 2 °C. Zebrice bi trebale biti stare približno 16 (± 2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 26 ± 2 °C.

PLAN ISPITIVANJA

21. Upotrebljavaju se tri koncentracije ispitivane kemikalije, jedna kontrolna skupina (voda) te po potrebi jedna kontrolna skupina za otapala. Podaci se mogu analizirati radi utvrđivanja statistički značajnih razlika među tretiranim i kontrolnim skupinama. Zahvaljujući tim analizama utvrdit će se je li potrebno daljnje, dugotrajnije ispitivanje štetnih učinaka kemikalije (odnosno na preživljavanje, razvoj, rast i reprodukciju), umjesto u svrhu procjene rizika (24).

22. U zebrica i medaka 21. dana pokusa uzimaju se uzorci mužjaka i ženki iz svake tretirane skupine svakom razinom kemikalije (pet mužjaka i pet ženki u svakoj od dviju replika) i iz kontrolne skupine u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih spolnih obilježja, tamo gdje je to primjenjivo. U debeloglave gavčice 21. dana izlaganja uzimaju se uzorci mužjaka i ženki (dva mužjaka i četiri ženke u svakoj od četiri replike) i kontrolne skupine u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih spolnih obilježja.

Odabir ispitnih koncentracija

23. Za potrebe ovog ispitivanja najvišu ispitnu koncentraciju potrebno je odrediti s pomoću maksimalne tolerirane koncentracije (MTK) utvrđene tablicom ili s pomoću ostalih podataka o toksičnosti, ili 10 mg/l, ili maksimalne količine koja se može otopiti u vodi, što god od toga je najmanje. MTK se definira kao najviša ispitna koncentracija kemikalije čija je posljedica smrtnost manja od 10 %. Ovaj pristup pretpostavlja da postoje empirijski podaci o akutnoj toksičnosti ili ostali podaci o toksičnosti iz kojih se može procijeniti MTK. Procjena MTK-a može biti neprecizna pa je u pravilu potrebna stručna procjena.

▼M6

24. Potrebne su tri ispitne koncentracije, raspoređene s pomoću stalnog faktora koji ne premašuje 10 te kontrolna skupina s vodom (i po potrebi kontrolna skupina za otapalo). Preporučuje se raspon faktora raspoređivanja od 3,2 do 10.

POSTUPAK

Odabir i vaganje riba za ispitivanje

25. Važno je da se razlike u težini riba na početku testa svedu na najmanju moguću mjeru. Odgovarajući rasponi veličina za različite vrste preporučene za ovo ispitivanje navedeni su u Dodatku 2. Za cijelu seriju riba koja se upotrebljava u ovom ispitivanju pojedinačne težine mužjaka i ženki na početku ispitivanja trebale bi se po mogućnosti kretati u rasponu od ± 20 % aritmetičke srednje težine za ribe istog spola. Prije početka ispitivanja preporučuje se vaganje pod-uzorka riblje populacije radi procjene srednje mase.

Uvjeti izlaganja

Trajanje

26. Nakon razdoblja prije izlaganja ispitivanje traje 21 dan. Preporučuje se jednotjedno razdoblje prije izlaganja.

Hranjenje

27. Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* odgovarajućom hranom (Dodatak 2.) u količinama dovoljnima za zadržavanje tjelesne forme. Potrebno je paziti da ne dođe do povećanja broja mikroba i zamućenja vode. Opća je smjernica da se dnevna količina hrane može podijeliti u dvije ili tri jednake porcije za višekratno hranjenje tijekom dana, pri čemu razmak između hranjenja mora biti najmanje tri sata. Prihvatljiva je i jedna velika porcija, posebno tijekom vikenda. Ribe nije potrebno hraniti 12 sati prije uzorkovanja/seciranja.

28. Hranu za ribe potrebno je procijeniti u smislu postojanja kontaminanata poput organoklorovih pesticida, policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), polikloriranih bifenola (PCB). Potrebno je izbjegavati hranu s povišenom razinom fitoestrogena koji bi utjecali na reakciju na test na poznati agonist estrogena (primjerice 17-beta estradiol).

29. Nepojedenu hranu i fekalije potrebno je uklanjati iz ispitnih akvarija najmanje dvaput tjedno, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona.

Svjetlo i temperatura

30. Duljinu izlaganja svjetlu i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ribljoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Učestalost analitičkih utvrđivanja i mjerenja

31. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna saznanja o kemijskoj stabilnosti u ispitnom sustavu. Tijekom ispitivanja, koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u redovnim intervalima kako slijedi: stope protoka razrjeđivača i toksične radne otopine potrebno je provjeravati po mogućnosti svakodnevno, a najmanje dvaput tjedno; one ne bi trebale varirati više od 10 % tijekom ispitivanja. Preporučuje se mjerenje stvarnih koncentracija ispitivane kemikalije u svim akvarijima na početku ispitivanja, a potom svakog tjedna.

32. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno zadržana unutar 20 % nominalne koncentracije, tada se rezultati mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima.

33. U pojedinim je slučajevima uzorke potrebno filtrirati (primjerice s pomoću veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati. U slučaju potrebe preporučuje se centrifugiranje. Ipak, ako se ispitivani materijal ne adsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje.

▼M6

34. Tijekom ispitivanja potrebno je mjeriti otopljeni kisik, temperaturu i pH-vrijednost u svim ispitnim akvarijima najmanje jednom tjedno. Ukupnu tvrdoću i lužnatost potrebno je mjeriti najmanje jednom tjedno u kontrolnim skupinama i jednom akvariju s najvišom koncentracijom. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednom ispitnom akvariju.

Zapažanja

35. Brojne opće (primjerice preživljavanje) i temeljne biološke reakcije (primjerice razine vitelogenina) procjenjuju se tijekom testa ili po njegovu završetku. Mjerenje i procjena tih krajnjih učinaka i njihova korist opisuju se u nastavku.

Preživljavanje

36. Ribe je tijekom razdoblja ispitivanja potrebno svakodnevno pregledavati i evidentirati smrtnost te u najkraćem mogućem roku uklanjati uginule ribe. Uginule ribe se ne nadomješta novima ni u kontrolnim ni u ispitnim posudama. Spol riba koje su uginule tijekom ispitivanja potrebno je utvrditi makroskopskom procjenom gonada.

Ponašanje i izgled

37. Potrebno je evidentirati svako neuobičajeno ponašanje (u odnosu na kontrolne skupine), što može uključivati znakove opće toksičnosti, uključujući hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, manjak ravnoteže te atipično mirovanje ili hranjenje. Potrebno je evidentirati i vanjske abnormalnosti (poput krvarenja, gubitka boje). Pri tumačenju podataka sve znakove toksičnosti potrebno je pažljivo razmotriti jer mogu ukazivati na koncentracije pri kojima biomarkeri endokrine aktivnosti nisu pouzdani. Ta zapažanja ponašanja mogu biti i korisne informacije za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Primjerice, teritorijalna agresivnost u normalnih mužjaka ili maskuliniziranih ženki uočena je u debeloglave gavčice u slučajevima izloženosti androgenima, a karakteristično parenje i mrijest zebrica u zoru s pojavom svjetla smanjeno je ili narušeno nakon izloženosti estrogenima ili antiandrogenima.

38. S obzirom na to da se neki aspekti izgleda (ponajprije boja) mogu pri hvatanju brzo promijeniti, važno je prije uklanjanja životinja iz ispitnog sustava obaviti zapažanja. Iz dosadašnjeg iskustva s debeloglavim gavčicama poznato je da neke endokrino aktivne kemikalije mogu u početku prouzročiti promjene u sljedećim vanjskim obilježjima: boji tijela (svijetla ili tamna), uzorcima boje (postojanje okomitih pruga) i obliku tijela (glava i prsno područje). Stoga je zapažanja o fizičkom izgledu riba potrebno obavljati tijekom ispitivanja i po završetku studije.

Humano usmrćivanje riba

39. Po završetku izlaganja, odnosno 21. dana, ribe je potrebno usmrtiti odgovarajućom količinom anestetika trikaina (Tricaine metan sulfonat, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l puferiran s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijev bikarbonat, CAS 144-55-8) kako bi se smanjila iritacija sluznice; nakon toga, uzorci krvi i tkiva uzimaju se radi utvrđivanja vitelogenina, kako se opisuje u odjeljku o vitelogeninu.

▼M6

Zapažanja u pogledu sekundarnih spolnih obilježja

40. Neke endokrino aktivne kemikalije mogu prouzročiti promjene posebnih sekundarnih spolnih obilježja (broj izraslina u spolno zrelih mužjaka debeloglave gavčice, papilarni procesi u mužjaka medake). Naime, kemikalije s određenim načinom djelovanja mogu prouzročiti neuobičajenu pojavu sekundarnih spolnih obilježja u životinja suprotnog spola: primjerice agonisti receptora za androgene, poput trenbolona, metiltestosterona i dihidrotestosterona, u spolno zrelih ženki debeloglave gavčice mogu prouzročiti pojavu izraženih izraslina, te papilarnih procesa u ženki medake (11, 20, 21). Poznato je i da agonisti receptora estrogena mogu prouzročiti smanjenje broja izraslina i veličine jastučića na potiljku odraslih mužjaka (25, 26). Ta makromorfološka zapažanja ponašanja mogu biti i korisni kvalitativni i kvantitativni podaci za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Broj i veličina izraslina u spolno zrele debeloglave gavčice i papilarnih procesa u medake mogu se kvantificirati izravno ili praktičnije iz očuvanih uzoraka. Preporučeni postupci za procjenu sekundarnih spolnih obilježja u debeloglave gavčice i medake nalaze se u Dodatku 5.A, odnosno Dodatku 5.B.

Vitelogenin (VTG)

41. Krv se uzima iz repne arterije/vene s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice ili punkcijom srca s pomoću šprice. Ovisno o veličini ribe, volumen krvi koja se uzima u pravilu se kreće od pet do 60 µl po jednoj debeloglavoj gavčici, odnosno od pet do 15 µl po jednoj zebrici. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem te pohranjuje s inhibitorima proteaze na – 80 °C do analize vitelogenina. Druga je mogućnost upotreba jetre medake, odnosno homogenata s glave/repa zebrice kao izvora tkiva za utvrđivanje vitelogenina (Dodatak 6.). Mjerenje VTG-a trebalo bi se temeljiti na potvrđenoj odgovarajućoj metodi ELISA s pomoću odgovarajućeg standarda VTG-a i odgovarajućih antitijela. Preporučuje se primjena metode s pomoću koje se mogu otkriti niske razine VTG-a od nekoliko ng/ml plazme (ili ng/mg tkiva), što je osnovna razina u neizloženih mužjaka riba.

42. Kontrola kvalitete analize vitelogenina obavljat će se s pomoću standarda, slijepih proba i najmanje dvostrukih analiza. Za svaku metodu ELISA potrebno je provesti ispitivanje za učinak matrice (učinak razrjeđivanja uzorka) radi utvrđivanja minimalnog faktora razrjeđivanja uzorka. Na svakoj pločici ELISA za testove vitelogenina trebali bi se nalaziti sljedeći uzorci za kontrolu kvalitete: najmanje šest kalibracijskih standarda kojima je obuhvaćen raspon očekivanih koncentracija vitelogenina i najmanje jedna nespecifična, obvezujuća testna prazna proba (analizira se dva takva kompleta). Apsorpcija tih praznina trebala bi biti manja od 5 % maksimalne apsorpcije pri standardnoj kalibraciji. Analizirat će se najmanje dva alikvota (duplikati jažica) svakog razrjeđivanja uzorka. Duplikate jažica koji se razlikuju više od 20 % potrebno je ponovno analizirati.

43. Koeficijent korelacije (R^2) za krivulje kalibracije trebao bi biti veći od 0,99. Međutim, visoka korelacija nije dostatna za jamstvo odgovarajućeg predviđanja koncentracije u svim rasponima. Osim što ima dovoljno visoku korelaciju za krivulju kalibracije, koncentracija svakog standarda prema izračunu iz krivulje kalibracije trebala bi se kretati od 70 do 120 % nominalne koncentracije. U slučaju udaljavanja nominalnih koncentracija od

▼M6

linije regresije kalibracije (primjerice pri nižim koncentracijama) može se pojaviti potreba za razdvajanjem krivulje kalibracije u niske i visoke raspone ili potreba za primjenom nelinearnog modela za odgovarajuće prilagođavanje podataka o apsorpciji. U slučaju razdvajanja krivulje, oba segmenta linije trebala bi imati $R^2 > 0,99$.

44. Granica otkrivanja (engl. *limit of detection*, LOD) definira se kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda, dok se granica kvantitacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ) definira kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda pomnožena s najnižim faktorom razrjeđivanja.

45. Svakog dana provođenja testova vitelogenina analizirat će se uzorak za utvrđivanje izrađen s pomoću referentnog standarda dobivenog ponavljanjem testa (inter-assay) (Dodatak 7.). Omjer očekivane i izmjerene koncentracije bilježit će se uz rezultate svakog kompleta testova provedenog tog dana.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena reakcija biomarkera s pomoću analize varijance (ANOVA)

46. Reakcije tretiranih i kontrolnih skupina uspoređuju se s pomoću analize varijance (ANOVA) radi identifikacije moguće endokrine aktivnosti kemikalije. U slučaju upotrebe kontrolne skupine za otapalo, potrebno je za svaki krajnji učinak provesti odgovarajuće statističko ispitivanje između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i kontrolnih skupina s otapalom. Smjernice o načinu obrade podataka za kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje i otapalom u naknadnoj statističkoj analizi nalaze se u dokumentu OECD, 2006.c (27). Sve podatke o biološkim reakcijama potrebno je analizirati i o njima izvijestiti zasebno prema spolu. Ako nisu zadovoljene tražene pretpostavke za parametrijske metode – nenormalna distribucija (npr. Shapiro-Wilkov test) ili heterogena varijanca (Bartlettov test ili Leveneov), potrebno je razmotriti mogućnost da se prije provedbe ANOVA-e podaci preoblikuju radi homogenizacije varijanci ili provesti ponderiranu ANOVA-u. Za neujednačenu reakciju na dozu mogu se upotrijebiti Dunnettov test (parametrijski) na višestrukim usporedbama parova ili Mann-Whitneyev test s prilagodbom Bonferroni (neparametrijski). Ako je reakcija na dozu približno ujednačena, mogu se upotrijebiti ostali statistički testovi (primjerice, Jonckheere-Terpstrin ili Williamsov test). Statistički dijagram nalazi se u Dodatku 8. i pomoć je pri odabiru najprikladnijeg statističkog testa za upotrebu. Dodatne informacije nalaze se i u OECD-ovu Dokumentu o postojećim pristupima statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti (27).

Izvješćivanje o rezultatima ispitivanja

47. Podaci o studiji trebali bi uključivati:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje:

— odgovorne osobe i njihove odgovornosti tijekom studije,

— svaki laboratorij treba biti dokazano stručan u upotrebi niza reprezentativnih kemikalija.

Ispitivana kemikalija:

— karakterizaciju ispitivane kemikalije,

— fizikalnu narav i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

▼**M6**

— metodu i učestalost pripreme ispitnih koncentracija,

— informacije o stabilnosti i biorazgradivosti.

Otapalo:

— karakterizaciju otapala (svojstva, upotrijebljena koncentracija),

— obrazloženje odabira otapala (ako nije riječ o vodi).

Pokusne životinje:

— vrstu i subpopulaciju,

— dobavljača i njegov posebni objekt,

— starost riba na početku ispitivanja i reproduktivni status / status mrijesta,

— podatke o postupku aklimatizacije životinja,

— tjelesnu masu riba na početku izlaganja (iz poduzorka upotrijebljenog ribljeg jata).

Ispitni uvjeti:

— primijenjeni postupak ispitivanja (vrsta ispitivanja, broj i masa riba u odnosu na prostor odn. litražu akvarija itd.),

— metodu pripreme radne otopine i stopu protoka,

— nominalne ispitne koncentracije, tjedne izmjerene vrijednosti koncentracija ispitnih otopina i primijenjene analitičke metode, srednje izmjerene vrijednosti i standardna odstupanja u ispitnim posudama te dokaze da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitne kemikalije u stvarnoj otopini,

— karakteristike vode za razrjeđivanje (uključujući pH-vrijednost, tvrdoću, lužnatost, temperaturu, koncentraciju otopljenog kisika, razine rezidualnog klora, ukupni organski ugljik, suspendirane krute tvari i sve ostale izmjerene vrijednosti),

— kvalitetu vode u ispitnim akvarijima: pH-vrijednost, tvrdoću, temperaturu i koncentraciju otopljenog kisika,

— precizne informacije o hranjenju (primjerice vrsti/vrstama hrane, porijeklu, količini i učestalosti hranjenja te analizu relevantnih kontaminanata, ako postoji (primjerice poliklorirani bifenili, policiklički aromatski ugljikovodici i organoklorovi pesticidi).

Rezultati:

— dokaze da su kontrolne skupine u skladu s kriterijima prihvatljivosti ispitivanja,

— podatke o smrtnosti u svim ispitnim koncentracijama i kontrolnim skupinama,

— primijenjene statističke analitičke metode, obradu podataka i obrazloženje primijenjenih metoda,

— podatke o biološkim zapažanjima makromorfologije, uključujući sekundarna spolna obilježja i vitelogenin,

▼M6

— rezultate analiza podataka, poželjno u tabličnom i grafičkom obliku,

— pojavu neobičnih reakcija riba i sve vidljive učinke ispitivane kemikalije.

SMJERNICE ZA TUMAČENJE I PRIHVAĆANJE REZULTATA ISPITIVANJA

48. U ovom se odlomku navode određena razmatranja koje treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata ispitivanja različitih izmjerenih krajnjih učinaka. Rezultate je potrebno oprezno tumačiti kad se čini da ispitivana kemikalija prouzročuje vidljivu toksičnost ili utječe na opće stanje pokusne životinje.

49. Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija, kako bi s moglo valjano tumačiti podatke, potrebno je paziti da se ne premaši maksimalna tolerirana koncentracija. Važno je da postoji najmanje jedna tretirana skupina na kojoj se ne pojavljuju znakovi toksičnih učinaka. Znakove bolesti i toksičnih učinaka potrebno je detaljno ocijeniti i o njima izvijestiti. Primjerice, moguće je da na nastajanje vitelogenina u ženki utječu i opća toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, primjerice hepatotoksičnost. Međutim, u tumačenju učinaka postiže se veća sigurnost ako postoje druge tretirane skupine, tretirane različitim koncentracijama, koje nisu narušene sustavnom toksičnošću.

50. Za prihvaćanje rezultata ispitivanja potrebno je razmotriti nekoliko aspekata. Primjerice, razine VTG-a u kontrolnim skupinama mužjaka i ženki trebale bi biti jasne i razlikovati se za približno tri reda veličine u debeloglave gavčice i zebrice, odnosno za jedan red veličine u medake. Primjeri raspona vrijednosti u kontrolnim i tretiranim skupinama nalaze se u izvješćima o validaciji (1, 2, 3, 4). Visoke vrijednosti VTG-a u mužjaka iz kontrolnih skupina mogu utjecati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja slabih agonista estrogena. Niske vrijednosti VTG-a u ženki iz kontrolnih skupina mogu utjecati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja inhibitora aromataze i antagonista estrogena. Validacijske studije upotrebljavale su se za izradu te smjernice.

51. Ako laboratorij nije ranije proveo test ili ako je došlo do znatnih promjena (primjerice promjene riblje subpopulacije ili dobavljača), savjetuje se provedba studije tehničke osposobljenosti. Preporučuje se upotreba kemikalija kojima je obuhvaćen raspon načina djelovanja ili učinaka na brojne ispitne krajnje učinke. U praksi se svaki laboratorij potiče na izradu vlastitih povijesnih kontrolnih podataka za mužjake i ženke i na primjenu pozitivne kontrolne kemikalije za estrogensko djelovanje (primjerice 17β-estradiola pri 100 ng/l ili poznatog slabog agonista) čija je posljedica povećanje VTG-a u mužjaka riba, pozitivne kontrolne kemikalije za inhibiciju aromataze (primjerice fadrozol ili prokloraz pri 300 µg/l) čija je posljedica smanjenje VTG-a u ženki riba te pozitivne kontrolne kemikalije za androgensko djelovanje (primjerice 17β-trenbolon pri 5 µg/l) čija je posljedica indukcija sekundarnih spolnih obilježja u ženki debeloglave gavčice i medake. Svi ti podaci mogu se usporediti s dostupnim podacima iz validacijskih studija (1, 2, 3) kako bi se osigurala osposobljenost laboratorija.

52. Općenito, vrijednosti vitelogenina smatraju se pozitivnima ako je došlo do statistički značajnog povećanja VTG-a u mužjaka ($p < 0,05$) ili statistički značajnog smanjenja u ženki ($p < 0,05$) najmanje pri najvećoj ispitivanoj dozi u usporedbi s kontrolnom skupinom te u izostanku znakova opće toksičnosti. Pozitivan rezultat dodatno je potkrijepljen demonstracijom biološki vjerojatnog odnosa između doze i krivulje reakcije. Kako je prethodno navedeno, smanjenje vitelogenina ne mora u potpunosti biti endokrinog podrijetla, ali pozitivan rezultat u pravilu bi trebalo tumačiti kao dokaz endokrinog djelovanja *in vivo* te je potrebno pokrenuti aktivnosti u svrhu dodatnih pojašnjenja.

▼**M6**

LITERATURA

(1) OECD (2006.a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006.)27.

(2) OECD (2006.b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006.)29.

(3) OECD (2007.). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007.)25.

(4) Owens JW (2007.). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (pristupljeno: 18. rujna 2008.).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Neobjavljeno izvješće od 15. prosinca 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. str. 104.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008.)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995.). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004.). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3): 277. – 91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006.). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4): 343. – 52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002.). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences;67(1): 121. – 30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004.). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1): 11. – 21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999.). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2): 113. – 25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelles, Belgija.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001.). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217. – 232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001.). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119. – 131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531. – 539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699 – 1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4: 87. – 98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301. – 308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003.). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350. – 60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004.). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3): 774. – 81.

(22) OECD (2000.) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Pariz

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006.a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; str. 69. – 92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006.b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1: 106. – 14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129. – 145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478. – 488.

(27) OECD (2006.c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006.)18

(28) OECD (2012.) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012.)22

▼**M6**

Dodatak 1.

Kratice i definicije

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV: koeficijent varijacije (engl. *Coefficient of variation*, CV).

ELISA: Imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa riba u odnosu na određenu količinu vode.

Broj riba u odnosu na prostor: broj riba u odnosu na određenu količinu vode.

VTG (vitelogenin): fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje polažu jaja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

MTK: maksimalna tolerirana koncentracija, iznosi približno 10 % LC_{50}.

Ispitivana kemikalija: sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼**M6**

Dodatak 2.

Eksperimentalni uvjeti za test probira endokrinog sustava riba

1 Preporučene vrste	**Debeloglava gavčica** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Zebrica** (*Danio rerio*)
2. Vrsta ispitivanja	Protok	Protok	Protok
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar)	Fluorescentne žarulje (široki spektar)	Fluorescentne žarulje (široki spektar)
5. Intenzitet svjetla	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)
6. Fotoperiod (prijelazi iz zore u sumrak su mogući, ali ne smatraju se nužnima)	16 sati svjetla, 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame
7. Masa riba u odnosu na prostor	< 5 g po l	< 5 g po l	< 5 g po l
8. Veličina ispitne komore	Najmanje 10 l	Najmanje 2 l	Najmanje 5 l
9. Volumen ispitne otopine	Najmanje 8 l	Najmanje 1,5 l	Najmanje 4 l
10. Izmjene volumena ispitnih otopina	Najmanje šest puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno
11. Starost ispitnih organizama	Vidjeti stavak 20.	Vidjeti stavak 20.	Vidjeti stavak 20.
12. Približna mokra masa odraslih riba (g)	Ženke: 1,5 ± 20 % Mužjaci: 2,5 ± 20 %	Ženke: 0,35 ± 20 % Mužjaci: 0,35 ± 20 %	Ženke: 0,65 ± 20 % Mužjaci: 0,4 ± 20 %
13. Broj riba po ispitnoj posudi	Šest (dva mužjaka i četiri ženke)	Deset (pet mužjaka i pet ženki)	Deset (pet mužjaka i pet ženki)
14. Broj tretiranih skupina	= tri (uvećano za odgovarajuće kontrolne skupine)	= tri (uvećano za odgovarajuće kontrolne skupine)	= tri (uvećano za odgovarajuće kontrolne skupine)
15. Broj posuda (akvarija) po tretiranoj skupini	Najmanje četiri	Najmanje dvije	Najmanje dvije
16. Broj riba po ispitnoj koncentraciji	16 odraslih ženki i osam mužjaka (četiri ženke i dva mužjaka u svakoj posudi replici)	Deset odraslih ženki i deset mužjaka (pet ženki i pet mužjaka u svakoj posudi replici)	Deset odraslih ženki i deset mužjaka (pet ženki i pet mužjaka u svakoj posudi replici)
17. Raspored hranjenja	Živi ili zamrznuti Artemia račići ili njihove ličinke dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Ličinke Artemia račića dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Ličinke Artemia račića dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga

▼M6

18. Dozračivanje (aeracija)	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja kisikom	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja kisikom	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja kisikom
19. Voda za razrjeđivanje	Čista površinska, izvorska ili voda dobivena miješanjem destilirane vode i odgovarajućeg masenog udjela minerala ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor	Čista površinska, izvorska ili voda dobivena miješanjem destilirane vode i odgovarajućeg masenog udjela minerala ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor	Čista površinska, izvorska ili voda dobivena miješanjem destilirane vode i odgovarajućeg masenog udjela minerala ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor
20. Razdoblje prije izlaganja	Preporučuje se sedam dana	Preporučuje se sedam dana	Preporučuje se sedam dana
21. Trajanje izlaganja kemikaliji	21 dan	21 dan	21 dan
22. Biološki krajnji učinci	preživljavanje, ponašanje, spolna obilježja 2y, VTG	preživljavanje, ponašanje, spolna obilježja 2y, VTG	preživljavanje, ponašanje, VTG
23. Prihvatljivost ispitivanja	Otopljeni kisik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti po razini tretmana.	Otopljeni kisik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti po razini tretmana.	Otopljeni kisik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti po razini tretmana.

▼**M6**

Dodatak 3.

Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

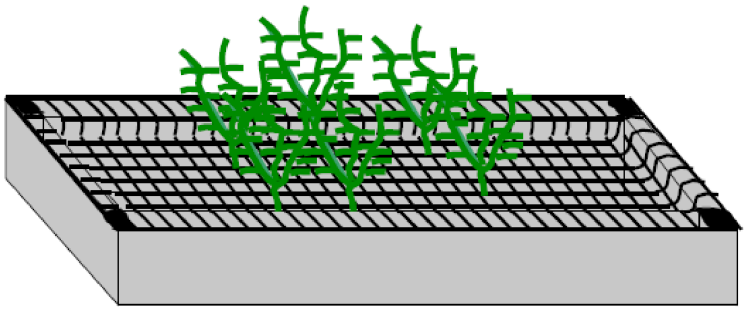
Sastojak	KONCENTRACIJE
Lebdeće čestice	< 20mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organoklorovi pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatak 4.A

Supstrat za mrijest zebrice

Ladica za mrijest: staklena, dimenzija primjerice 22 × 15 × 5,5 cm (d × š × v), prekrivena pomičnom žičanom rešetkom od nehrđajućeg čelika (mreža širine 2 mm). Rešetka bi trebala prekrivati otvor posude ispod ruba.



Supstrat za mrijest potrebno je postaviti na rešetku. To bi trebao biti prostor u koji ribe mogu ulaziti. Primjerice, prikladno je umjetno akvarijsko bilje izrađeno od zelene plastike (napomena: potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane kemikalije na plastiku). Plastiku je potrebno dovoljno dugo ispirati dovoljnom količinom tople vode kako bi se osiguralo da ne dođe do otpuštanja kemikalija u ispitnu vodu. Pri upotrebi stakla potrebno je osigurati da ne dođe do ozljeda ili prikliještenja riba tijekom njihova energičnog kretanja.

Udaljenost između ladice i stakla trebala bi biti najmanje 3 cm kako bi se osiguralo da do mrijesta ne dođe izvan posude. Jajašca izmriještena u ladicu padaju kroz rešetku i uzorci se mogu uzeti od 45 do 60 minuta nakon početka osvjetljavanja. Prozirna se jajašca ne lijepe i mogu se jednostavno prebrojiti s pomoću transverzalnog svjetla. Pri upotrebi pet ženki po posudi, do 20 jajašaca dnevno može se smatrati malim brojem, do 100 srednjim, a više od 100 velikim. Ladicu za mrijest potrebno je maknuti, jajašca ukloniti i vratiti ladicu u ispitnu posudu što kasnije navečer ili vrlo rano ujutro. Razdoblje do vraćanja ladice ne smije trajati dulje od jednog sata jer u suprotnom supstrat za mrijest može prouzročiti pojedinačno parenje i mrijest u neuobičajeno doba. U slučaju potrebe za kasnijim vraćanjem ladice za mrijest to je potrebno učiniti najmanje devet sati nakon početka osvjetljavanja. U to kasno doba dana više nema mrijesta.

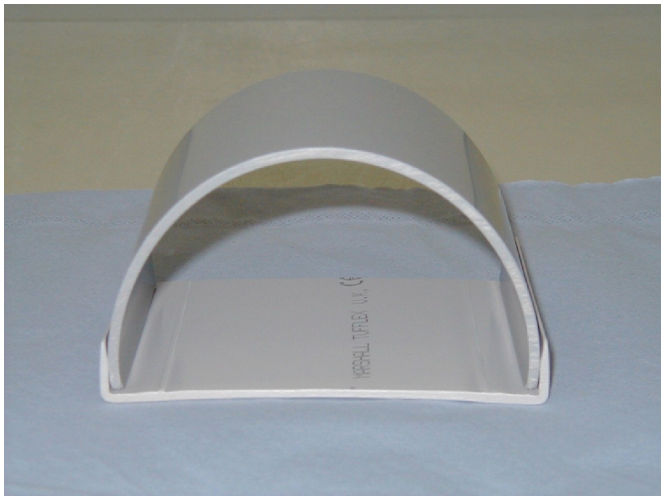
▼**M6**

Dodatak 4.B

Supstrat za mrijest debeloglave gavčice

Dvije ili tri kombinirane pločice i ladice za mrijest od plastike/keramike/stakla ili nehrđajućeg čelika smještaju se u svaku ispitnu komoru (primjerice sivi polukružni oluk dugačak 80 mm koji se nalazi na ladici U-profila dugačkoj 130 mm (vidi sliku). Pravilno obrađene plastične ili keramičke pločice pokazale su se prikladnima za supstrat za mrijest (Thorpe *et al*, 2007.).

Preporučuje se abrazija pločica kako bi se poboljšalo prianjanje. Ladicu je potrebno pregledati kako bi se ribama spriječio pristup palim jajašcima, osim ako je prianjanje jajašaca dokazano za primijenjeni supstrat za mrijest.



Podloga služi zadržavanju svih jajašaca koja se nisu prilijepila za površinu pločice i koja bi pala na dno akvarija (ili jajašaca koja su položena izravno na ravnu plastičnu podlogu). Sve supstrate za mrijest prije upotrebe potrebno je ispirati u vodi za razrjeđivanje najmanje 12 sati.

UPUĆIVANJA

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90. – 98.

▼M6

Dodatak 5.A

Procjena sekundarnih spolnih obilježja u debeloglave gavčice radi otkrivanja određenih endokrino aktivnih kemikalija

Pregled

Potencijalno važna obilježja fizičkog izgleda u odraslih debeloglavih gavčica pri ispitivanju endokrinih disruptora uključuju boju tijela (odnosno svijetlu/tamnu boju), uzorke boje (odnosno postojanje ili izostanak okomitih pruga), oblik tijela (odnosno oblik glave i prsnog područja, izduženost abdomena) te posebna sekundarna spolna obilježja (odnosno broj i veličina izraslina spolno zrelih riba, veličina hrpta ispred leđne peraje i leglice).

Izrasline se nalaze na glavi (hrptu ispred leđne peraje) reproduktivno aktivnih mužjaka debeloglave gavčice te su u pravilu postavljeni u bočno simetričnom uzorku (Jensen *et al.*, 2001.). U ženki iz kontrolnih skupina i mladih mužjaka i ženki nije uočen razvoj izraslina (Jensen *et al.*, 2001.). Moguća je pojava do osam pojedinačnih izraslina oko očiju i između nosnica mužjaka. Najviše izraslina i najveće izrasline nalaze se u dvjema usporednim linijama neposredno ispod nosnica i iznad usta. U brojnih riba skupine izraslina nalaze se ispod donje čeljusti; jedan par izraslina u pravilu se nalazi najbliže ustima, dok se oko trbuha mogu nalaziti do četiri izrasline. Stvarni broj izraslina rijetko premašuje 30 (raspon od 18 do 28; Jensen *et al.*, 2001.). Dominantne izrasline (u brojčanom smislu) prisutne su kao jedinstvena, relativno okrugla struktura čija je visina približno jednaka polumjeru. Većina reproduktivno aktivnih mužjaka ima i barem nekoliko izraslina koje su uvećane i izražene tako da ih je nemoguće razlikovati kao pojedinačne strukture.

Neke vrste endokrino disruptivnih kemikalija mogu prouzročiti neuobičajenu pojavu određenih sekundarnih spolnih obilježja u suprotnog spola; primjerice, agonisti receptora za androgene, poput 17β-metiltestosterona ili 17β-trenbolona, mogu prouzročiti razvoj izraslina u ženki debeloglave gavčice (Smith, 1974.; Ankley *et al.*, 2001.; 2003.), dok agonisti receptora za estrogene mogu prouzročiti smanjenje broja ili veličine izraslina u mužjaka (Miles-Richardson *et al.*, 1999.; Harries *et al.*, 2000).

U nastavku se nalazi opis obilježja izraslina u spolno zrelih debeloglavih gavčica na temelju postupaka koji se primjenjuju u laboratoriju američke Agencije za zaštitu okoliša u Duluthu, Minnesota. Posebne proizvode i/ili opremu moguće je zamijeniti sličnim dostupnim materijalima.

Najbolji je pregled s pomoću osvijetljenog povećala ili stereoskopskog mikroskopa s osvjetljenjem i lećom objektiva od 3x. Promatrajte leđa i glave riba (glava prema gledatelju).

a) Smjestite ribe u malu Petrijevu zdjelicu (primjerice promjera 100 mm) glavom prema naprijed i trbuhom prema dolje. Usmjerite tražilo kako biste prepoznali izrasline. Nježno i polako okrećite ribe s jedne na drugu stranu kako biste pronašli izrasline. Izbrojite i ocijenite izrasline.

b) Pregledajte površinu trbušne strane glave tako da ribu u Petrijevoj zdjelici smjestite leđima prema naprijed.

c) Promatranje svake ribe trebalo bi trajati najviše dvije minute.

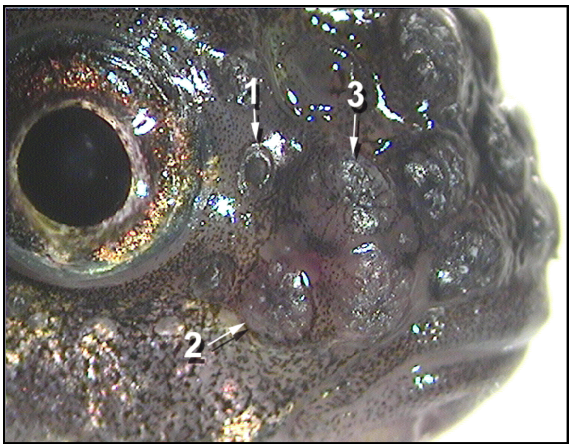
▼M6

Brojanje i ocjenjivanje izraslina

Utvrđeno je šest posebnih područja za ocjenu pojave i razvoja izraslina u odraslih debeloglavih gavčica. Izrađen je obrazac za evidentiranje mjesta i broja izraslina (vidi završetak ovog Dodatka). Broj se izraslina evidentira, a njihova se veličina ocjenjuje kao: 0 – izostanak, 1 – prisutne, 2 – uvećane i 3 – izražene za svaki organizam (slika 1.).

Ocjena 0 – izostanak izraslina. Ocjena 1 – prisutne odnosi se na sve izrasline s jednostrukim vrhom čija je visina gotovo jednaka njezinu polumjeru (promjeru). Ocjena 2 – uvećane odnosi se na tkivo koje nalikuje zvjezdici koje u pravilu ima veliku radijalnu osnovu s udubinama i brazdama koje se izdižu iz središta. Vrh izrasline često je više nazubljen, ali u nekim slučajevima može biti i zaobljen. Ocjena 3 – izražene odnosi se na prilično velike i zaobljene izrasline slabije definirane strukture. Te će izrasline u nekim slučajevima tvoriti jedinstvenu tvorbu duž jednog ili kombinacije područja (B, C i D, prema opisu u nastavku). Boja i uzorak nalikuju ocjeni 2, ali su u nekim slučajevima prilično neodređeni. Posljedica će primjene ovog sustava ocjenjivanja biti ukupne ocjene izraslina < 50 u normalnog kontrolnog mužjaka koji ima od 18 do 20 izraslina (Jensen *et al.*, 2001.).

Slika 1.



Stvarni broj izraslina u nekih riba može premašivati broj polja u obrascu za određeno područje ocjenjivanja (Dodatak A). U tom slučaju moguće je dodatne ocjene navesti desno ili lijevo od polja. Stoga obrazac ne treba biti simetričan. Dodatna metoda mapiranja izraslina koje su u paru ili se nalaze u skupinama duž horizontalne ravnine usta jest dvostruko označavanje dviju točaka za ocjenjivanje izraslina u jednom polju.

Područja mapiranja:

A – izrasline oko očiju. Nalaze se s leđne i trbušne strane oko prednjeg ruba oka. Često višestruke u zrelih mužjaka iz kontrolnih skupina, nisu prisutne u ženki iz kontrolnih skupina, u pravilu u paru (po jedna blizu svakog oka) ili jednostruke u ženki izloženih androgenima.

B – izrasline između nosnica (pora osjetilnih kanala). U pravilu u parovima u mužjaka iz kontrolnih skupina na višim razinama (2 – uvećane ili 3 – izražene) razvoja. Izraslina nema u ženki iz kontrolnih skupina, dok je u ženki izloženih androgenima uočena njihova pojava i razvoj.

C – izrasline neposredno ispred nosnica, paralelno s ustima. U pravilu uvećane ili izražene u zrelih mužjaka iz kontrolnih skupina. Prisutne ili uvećane u slabije razvijenih mužjaka ili ženki tretiranih androgenima.

▼**M6**

D – izrasline smještene paralelno duž linije ustiju. U pravilu se ocjenjuju kao razvijene u mužjaka iz kontrolnih skupina. Nema ih u ženki iz kontrolnih skupina, ali su prisutne u ženki izloženih androgenima.

E – izrasline na donjoj čeljusti, blizu usta, u pravilu malene i obično u parovima. Njihova pojava varira u mužjaka iz kontrolnih skupina, tretiranih mužjaka i tretiranih ženki.

F – izrasline s trbušne strane u odnosu na E. Obično malene i u parovima. Prisutne u mužjaka iz kontrolnih skupina i ženki izloženih androgenima.

UPUĆIVANJA

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001.). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas)*. *Environ Toxicol Chem* 20: 1276.–1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22: 1350.–1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas)*. Environ Sci Technol 34: 3003.–3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001.). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas)*. Comp Biochem Physiol C 128: 127.–141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001.). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59: 515.–523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas)*. Aquat Toxicol 47: 129.–145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas)*. Can J Zool 52: 1031.–1038.

Obrazac za ocjenu izraslina

Oznaka _____

Datum _____

Ukupna ocjena _____

Brojčana ocjena

1 – prisutne

2 – uvećane

3 – izražene

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M6

Dodatak 5.B

Procjena sekundarnih spolnih obilježja u medake radi otkrivanja određenih endokrino aktivnih kemikalija

U nastavku se opisuje mjerenje papilarnih procesa (*) koji su sekundarno spolno obilježje u medake (*Oryzias latipes*).

(*) Papilarni procesi u pravilu se pojavljuju samo u odraslih mužjaka te se nalaze na šipčicama peraja od druge do sedme ili osme od stražnjeg kraja podrepne peraje (slike 1. i 2.). Međutim, procesi se rijetko nalaze na prvoj šipčici peraje od stražnjeg kraja podrepne peraje. Ovim standardnim operativnim postupkom (SOP) obuhvaćeno je mjerenje procesa na prvoj šipčici peraje (u ovom SOP-u broj šipčice peraje odnosi se na redoslijed od stražnjeg kraja podrepne peraje).

(1) Nakon vađenja jetre (Dodatak 6.) truplo se stavlja u epruvetu s približno 10 ml 10-postotnog neutralnog puferiranog formalina (glavom prema gore). Ako je gonada fiksirana otopinom koja nije 10-postotni neutralni puferirani formalin, s pomoću skalpela napravite poprečni rez preko trupla između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa, pazeći pritom da ne oštetite gonoporu i samu gonadu (slika 3.). Stavite glavu ribe u otopinu za fiksiranje radi očuvanja gonade, a rep u 10-postotni neutralni puferirani formalin prema prethodnom opisu.

(2) Nakon što ste ribu stavili u 10-postotni neutralni puferirani formalin, pincetom uhvatite prednji dio podrepne peraje i držite ga presavijenog približno 30 sekundi kako biste otvorili podrepnu peraju. Pri hvatanju podrepne peraje pincetom uhvatite i nekoliko šipčica peraje u prednjem dijelu, pazeći pritom da ne ogrebete papilarne procese.

(3) Nakon što je podrepna peraja bila otvorena 30 sekundi, pohranite tijelo ribe u 10-postotni neutralni puferirani formalin na sobnoj temperaturi do mjerenja papilarnih procesa (mjerenje je potrebno provesti nakon najmanje 24-satnog fiksiranja).

Mjerenje

(1) Nakon fiksiranja tijela ribe u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalinu u trajanju od najmanje 24 sata, izvadite truplo ribe iz epruvete i obrišite formalin filtarskim papirom (ili papirnatim ručnikom).

(2) Položite ribu trbuhom prema gore. Škaricama pažljivo zarežite podrepnu peraju (poželjno je, osim podrepne peraje, odrezati i mali dio perajne potpore).

(3) Pincetom uhvatite prednji dio odrezane podrepne peraje i stavite ga na stakalce s nekoliko kapi vode. Potom podrepnu peraju pokrijte pokrivnim stakalcem. Pazite da pri hvatanju podrepne peraje pincetom ne ogrebete papilarne procese.

(4) Prebrojite kosti bodlje s papilarnim procesima s pomoću brojača pod biološkim mikroskopom (uspravni ili obrnuti mikroskop). Papilarni procesi uočavaju se kad je mala nakupina procesa vidljiva na stražnjem dijelu kosti bodlje. U obrazac zabilježite broj kosti bodlje s papilarnim procesima na

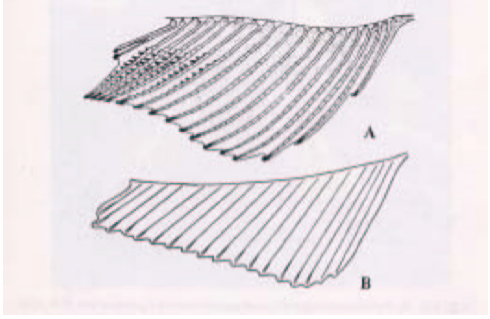
▼**M6**

svakoj šipčici peraje (primjerice, prva šipčica peraje: 0, druga šipčica peraje: 10, treća šipčica peraje: 12, itd.) te u tablicu u Excelu unesite zbroj tih brojeva prema pojedinačnim ribama. Po potrebi fotografirajte podrepnu peraju i na fotografiji prebrojite kosti bodlje s papilarnim procesima.

(5) Nakon mjerenja stavite podrepnu peraju u epruvetu kako je opisano u točki (1) i pohranite je.

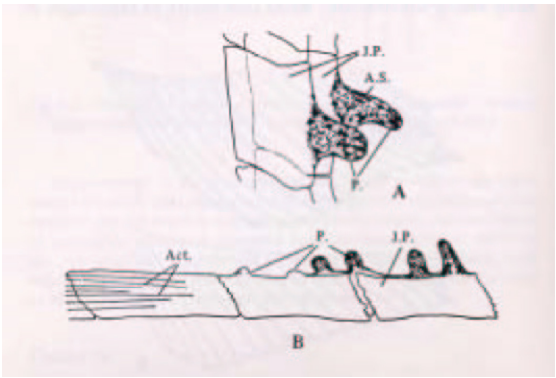
Slika 1.

Dijagram s prikazom spolnih razlika u obliku i veličini podrepne peraje. A, mužjak; B, ženka. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Slika 2.

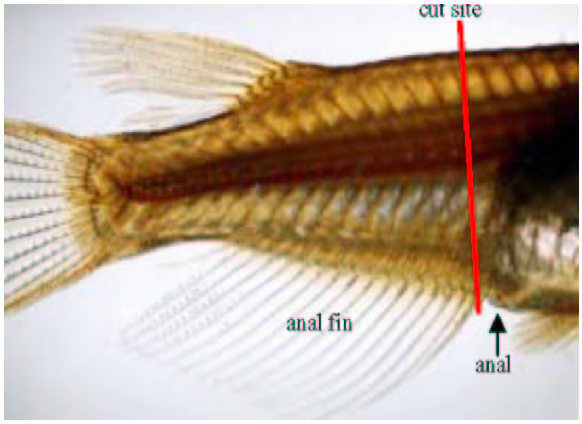
A – procesi na kostima bodlje šipčice podrepne peraje. J.P. – kost bodlje; A.S. – aksijalni prostor; P. – proces. B – krajnji dio šipčice peraje. Na vrhu se nalaze *Actinotrichia* (Act.). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼**M6**

Slika 3.

Fotografija tijela ribe i prikaz mjesta reza kad je gonada fiksirana u otopini za fiksiranje koja nije 10-postotni neutralni puferirani formalin. U tom slučaju ostatak tijela odrezat će se između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa s pomoću skalpela (crvena pruga); glava ribe stavit će se u otopinu za fiksiranje gonade, a rep u 10-postotni neutralni puferirani formalin.



▼M6

Dodatak 6.

Preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu vitelogenina

Potrebno je paziti da ne dođe do unakrsne kontaminacije uzoraka VTG-a mužjaka i ženki.

Postupak 1.A: debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Nakon anestezije, korijen repa se djelomično odvaja skalpelom i uzima se krv iz repne vene/arterije s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne epruvete. Nakon uzimanja krvi plazma se brzo izolira centrifugom pri 15 000 *g* u trajanju od tri minute (ili centrifugom u trajanju od deset minuta pri 15 000 *g* na 4 °C). Postotak hematokrita može se, po želji, utvrditi nakon centrifugiranja. Plazma se potom uklanja iz mikrohematokritske epruvete i pohranjuje u epruvetu za centrifugu uz 0,13 jedinica aprotinina (inhibitora proteaze) na – 80 °C do mogućnosti utvrđivanja vitelogenina. Ovisno o veličini debeloglave gavčice (koja ovisi o spolu), prikupljeni volumen plazme obično se kreće od pet do 60 mikrolitara po ribi (Jensen *et al.*, 2001.).

Postupak 1.B debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz srca

Druga je mogućnost uzimanje krvi punkcijom srca s pomoću heparinizirane šprice (1 000 jedinica heparina po ml). Krv se stavlja u Eppendorfove epruvete (koje se čuvaju na ledu) i potom centrifugira (pet minuta; 7 000 g, na sobnoj temperaturi). Plazmu treba premjestiti u čiste Eppendorfove epruvete (u alikvotima ako to dopušta volumen plazme) i odmah smrznuti na – 80 °C do analize (Panter *et al.*, 1998.).

Postupak 2.A: japanska medaka, vađenje jetre u medake

Uklanjanje pokusne ribe iz ispitne posude

(1) Pokusnu ribu potrebno je izvaditi iz ispitne posude malom mrežom u obliku žlice. Pazite da ne ispustite pokusnu ribu u ostale ispitne posude.

(2) Pokusne ribe u pravilu je potrebno vaditi sljedećim redoslijedom: kontrolna skupina, kontrola skupina s otapalom (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrolna skupina. Osim toga, iz ispitne posude treba izvaditi sve mužjake prije vađenja preostalih ženki.

(3) Spol pokusnih riba utvrđuje se na temelju vanjskih sekundarnih spolnih obilježja (primjerice oblika podrepne peraje).

(4) Stavite ribu u spremnik za transport i odnesite je do radne stanice radi vađenja jetre. Provjerite točnost oznaka na ispitnoj komori i spremniku za transport i provjerite je li broj riba koje su izvađene iz ispitne komore i broj riba preostalih u ispitnoj komori u skladu s očekivanjima.

(5) Ako se spol ne može utvrditi iz vanjskog izgleda riba, izvadite sve ribe iz ispitne komore. Spol je u tom slučaju potrebno utvrditi promatranjem gonade ili sekundarnih spolnih obilježja pod stereoskopskim mikroskopom.

▼**M6**

Vađenje jetre

(1) Premjestite pokusnu ribu iz spremnika za transport u otopinu anestetika malom mrežom u obliku žlice.

(2) Nakon anestezije pincetom (običnom) premjestite pokusnu ribu na filtarski papir (ili papirnati ručnik). Pri hvatanju pokusne ribe pincetom obuhvatite glavu kako ne bi došlo do kidanja repa.

(3) Obrišite vodu s površine pokusne ribe filtarskim papirom (ili papirnatim ručnikom).

(4) Položite ribu trbuhom prema gore. Potom škaricama napravite mali poprečni rez od leđnog dijela vrata do područja srednjeg trbuha.

(5) Umetnite škarice u mali rez i zarežite trbuh od točke sa stražnje strane škržnog plašta do prednje strane anusa duž središnje linije abdomena. Pazite da škarice ne umetnete preduboko kako ne bi došlo do oštećenja jetre i gonade.

(6) Obavite sljedeće postupke pod stereoskopskim mikroskopom.

(7) Položite pokusnu ribu trbuhom prema gore na papirnati ručnik (pri ruci moraju biti i staklena Petrijeva zdjelica ili stakalce).

(8) Proširite stijenke trbušne šupljine preciznom pincetom i izvadite unutarnje organe. Prihvatljivo je, po potrebi, i vađenje unutarnjih organa uklanjanjem jedne strane stijenke trbušne šupljine.

(9) Otkrijte spojeni dio jetre i žučnog mjehura drugom preciznom pincetom. Potom uhvatite žučni kanal i odrežite žučni mjehur. Pazite da ne dođe do trganja žučnog mjehura.

(10) Uhvatite jednjak i na isti način razdvojite probavni trakt od jetre. Pazite da ne dođe do izlijevanja sadržaja probavnog trakta. Odvojite stražnji dio probavnog trakta od anusa i izvadite ga iz trbušne šupljine.

(11) Uklonite mast i ostala tkiva s vanjskog dijela jetre. Pazite da ne ogrebete jetru.

(12) Preciznom pincetom uhvatite jetru i uklonite je iz trbušne šupljine.

(13) Položite jetru na stakalce. Po potrebi, s površine jetre preciznom pincetom uklonite višak masti i okolnog tkiva (primjerice trbušnu ovojnicu).

(14) Izvažite jetru s pomoću elektroničke analitičke vage i mikroepruvete od 1,5 ml kao tare. Zabilježite vrijednost u obrazac (očitanje: 0,1 mg). Potvrdite podatke o identifikaciji na naljepnici mikroepruvete.

(15) Zatvorite poklopac mikroepruvete u kojoj se nalazi jetra. Pohranite je u stalak za hlađenje (ili stalak s ledom).

(16) Nakon vađenja jedne jetre instrumente očistite ili ih zamijenite čistima.

▼M6

(17) Izvadite jetre svim ribama u spremniku za transport kako je prethodno opisano.

(18) Nakon vađenja jetara svim ribama u spremniku za transport (odnosno svim mužjacima ili ženkama u ispitnoj komori) stavite sve uzorke jetara u stalak za epruvete s identifikacijskom oznakom i pohranite ih u zamrzivač. U slučaju uzimanja jetara za preliminarno tretiranje ubrzo nakon vađenja primjerci se do sljedeće radne stanice nose u stalku za hlađenje (ili stalku s ledom).

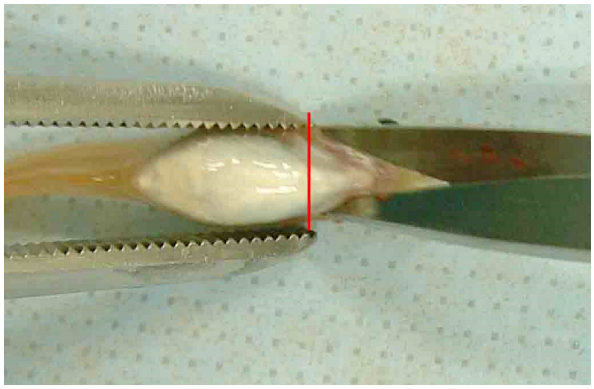
Nakon vađenja jetre truplo ribe podvrgava se mjerenju sekundarnih spolnih obilježja.

Uzorak

Pohranite uzorke jetara pokusnih riba na ≤ – 70 °C ako se one ne podvrgavaju preliminarnom tretiranju ubrzo nakon vađenja.

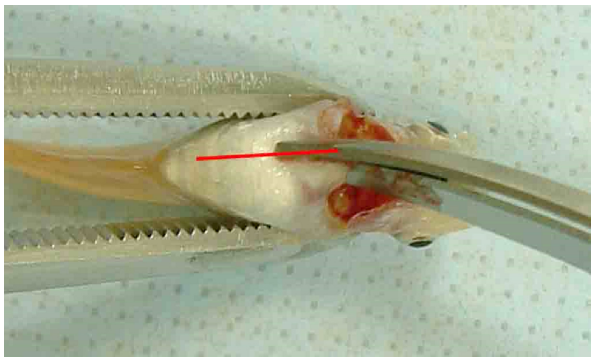
Slika 1.

Škarama se načini rez neposredno ispred prsnih peraja.



Slika 2.

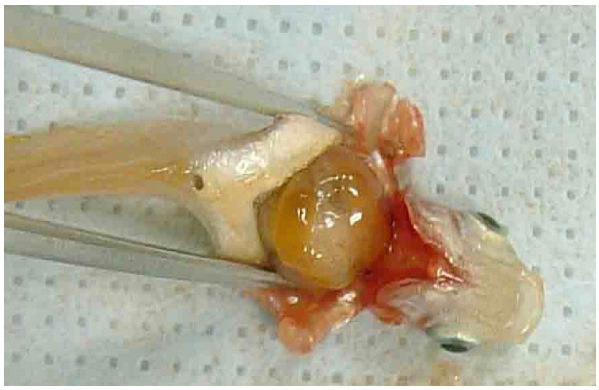
Škarama se razreže središnja linija abdomena do točke približno 2 mm od kranijalne strane anusa.



▼M6

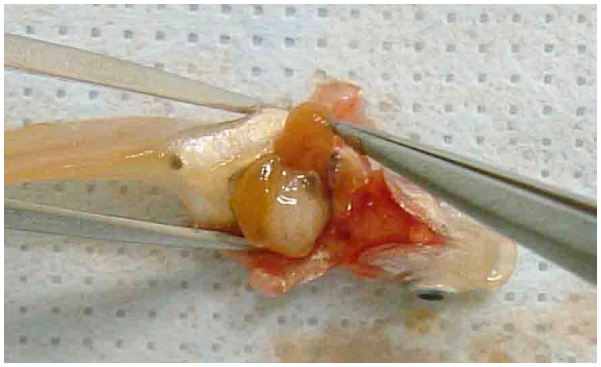
Slika 3.

Pincetom se trbušne stijenke šire radi vađenja jetre i ostalih unutarnjih organa. (Druga je mogućnost bočno pričvrstiti trbušne stijenke).



Slika 4.

Jetra se izrezuje i vadi s pomoću pincete.



Slika 5.

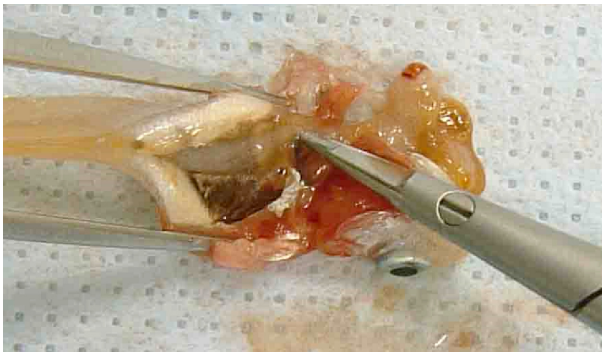
Crijeva se nježno povlače pincetom.



▼M6

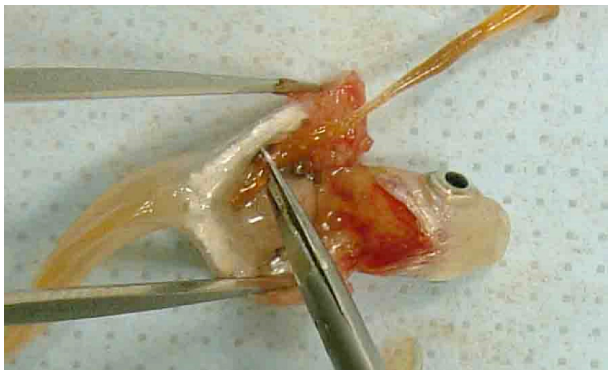
Slika 6.

Škarama se režu oba kraja crijeva i sva mezenterička vezivna tkiva.



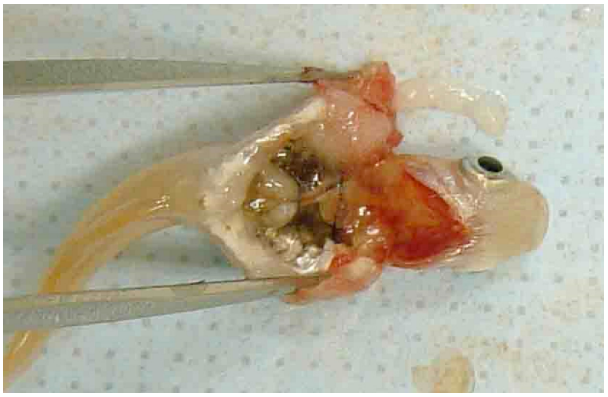
Slika 7. (ženka)

Postupak je jednak za ženke.



Slika 8.

Kraj postupka.



Postupak 2.B: japanska medaka (*Oryzias latipes*), preliminarno tretiranje jetre za analizu vitelogenina

Uzmite bocu homogenizacijskog pufera iz kompleta za analizu ELISA i ohladite je smrvljenim ledom (temperatura otopine: ≤ 4 °C). U slučaju upotrebe homogenizacijskog pufera iz sustava EnBio ELISA otopite otopinu na sobnu temperaturu, a potom bocu ohladite smrvljenim ledom.

▼**M6**

Izračunajte volumen homogenizacijskog pufera za jetru na temelju njezine mase (dodajte 50 µl homogenizacijskog pufera po mg mase jetre za homogenat). Primjerice, ako masa jetre iznosi 4,5 µl, volumen homogenizacijskog pufera za jetru iznosi 225 µl. Sastavite popis volumena homogenizacijskog pufera za sve jetre.

Priprema jetre za preliminarno tretiranje

(1) Neposredno prije tretiranja iz zamrzivača izvadite mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

(2) Preliminarno tretiranje jetre mužjaka potrebno je obaviti prije ženki kako bi se izbjegla kontaminacija vitelogenina. Osim toga, preliminarno tretiranje ispitnih skupina potrebno je obaviti sljedećim redoslijedom: kontrolna skupina, kontrolna skupina za otapalo (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrola.

(3) Broj mikroepruveta od 1,5 ml s primjercima jetara izvađenih iz zamrzivača u određenom trenutku ne smije premašiti broj mikroepruveta koje je moguće istovremeno centrifugirati.

(4) Poredajte mikroepruvete od 1,5 ml s primjercima jetara prema redoslijedu broja primjerka na stalku s ledom (jetre ne treba otapati).

Postupak preliminarnog tretiranja

1. Dodavanje homogenizacijskog pufera

(1) Provjerite popis kako biste utvrdili koji je volumen homogenizacijskog pufera potrebno upotrijebiti za određeni uzorak jetre i podesite mikropipetu (raspon volumena: 100 – 1 000 µl) na odgovarajući volumen. Na mikropipetu stavite čisti vrh.

(2) Uzmite homogenizacijski pufer iz boce s reagensom i dodajte pufer u mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

(3) Dodajte homogenizacijski pufer u sve mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi jetra prema prethodno opisanom postupku. Vrh mikropipete nije potrebno zamijeniti novim. Međutim, vrh je potrebno zamijeniti ako je kontaminiran ili se sumnja na kontaminaciju.

2. Homogenizacija jetre

(1) Na homogenizator mikroepruveta stavite novi tučak za homogenizaciju.

(2) Stavite tučak u mikroepruvetu od 1,5 ml. Držite homogenizator mikroepruveta tako da jetru pritišćete između površine tučka i unutarnje stijenke mikroepruvete od 1,5 ml.

(3) Uključite homogenizator mikroepruveta na 10 do 20 sekundi. Tijekom postupka hladite mikroepruvetu od 1,5 ml smrvljenim ledom.

(4) Izvadite tučak iz mikroepruvete i odložite je na približno deset sekundi. Potom vizualnim pregledom utvrdite stanje suspenzije.

(5) Ako su u suspenziji vidljivi djelići jetre, ponovite postupke (3) i (4) kako biste pripremili zadovoljavajući homogenat jetre.

▼**M6**

(6) Ohladite suspendirani homogenat jetre na stalku s ledom do centrifugiranja.

(7) Mijenjajte tučak za svaki homogenat.

(8) Homogenizirajte sve jetre homogenizacijskim puferom prema prethodno opisanom postupku.

3. Centrifugiranje suspendiranog homogenata jetre

(1) Provjerite je li temperatura rashlađene komore za centrifugiranje ≤ 5 °C.

(2) Stavite mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi suspendirani homogenat jetre u rashlađenu centrifugu (po potrebi prilagodite ravnotežu).

(3) Centrifugirajte suspendirani homogenat jetre deset minuta pri 13 000 g na ≤ 5 °C. Međutim, u slučaju pravilne separacije supernatanta centrifugalnu silu i vrijeme moguće je prilagoditi po potrebi.

(4) Nakon centrifugiranja provjerite jesu li supernatanti pravilno separirani (površina: lipidi, sredina: supernatant, donji sloj: tkivo jetre). U slučaju nepravilne separacije suspenziju ponovno centrifugirajte u istim uvjetima.

(5) Iz rashlađene centrifuge izvadite sve uzorke i poredajte ih prema broju uzorka na stalku s ledom. Pazite da nakon centrifugiranja ne dođe do ponovne suspenzije separiranih slojeva.

4. Vađenje supernatanta

(1) U stalak za epruvete stavite četiri mikroepruvete od 0,5 ml za pohranu supernatanta.

(2) Mikropipetom izvadite 30 µl svakog supernatanta (separiranog kao srednji sloj) i stavite u jednu mikroepruvetu od 0,5 ml. Pazite da ne zahvatite lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

(3) Izvadite supernatant i stavite ga u druge dvije mikroepruvete od 0,5 ml na prethodno opisani način.

(4) Mikropipetom izvadite ostatak supernatanta (po mogućnosti: ≥ 100 µl). Potom ga stavite u preostalu mikroepruvetu od 0,5 ml. Pazite da ne zahvatite lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

(5) Zatvorite poklopac mikroepruvete od 0,5 ml i na naljepnicu zapišite volumen supernatanta. Mikroepruvete potom odmah ohladite na stalku s ledom.

(6) Mijenjajte vrh mikropipete za svaki supernatant. Ako se na vrhu nakupi velika količina lipida, odmah ga promijenite kako ne bi došlo do kontaminacije ekstrakta jetre mašću.

(7) Stavite sav centrifugirani supernatant u četiri mikroepruvete od 0,5 ml prema prethodno opisanom postupku.

▼M6

(8) Sve mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant stavite u stalak za epruvete s identifikacijskim oznakama i potom ih odmah zamrznite u zamrzivaču. U slučaju mjerenja koncentracija VTG-a neposredno nakon preliminarnog tretiranja ostavite jednu mikroepruvetu od 0,5 ml (u kojoj se nalazi 30 µl supernatanta) da se hladi u stalku za epruvete i odnesite je do radne stanice gdje se provodi test ELISA. U tom slučaju stavite preostale mikroepruvete u stalke za epruvete i zamrznite ih u zamrzivaču.

(9) Nakon vađenja supernatanta ostatke zbrinite na odgovarajući način.

Čuvanje uzorka

Mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant homogenata jetre čuvajte na ≤ – 70 °C do upotrebe za test ELISA.

Postupak 3.A: zebrica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Neposredno nakon anestezije korijen repa poprečno se zarezuje i uzima se krv iz repne arterije/vene s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne epruvete. Volumen krvi kreće se od pet do 15 µl ovisno o veličini ribe. Jednaki volumen pufera aprotinina (6 µgml u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom) dodaje se u mikrokapilarnu epruvetu, dok se plazma centrifugiranjem odvaja od krvi (pet minuta pri 600 g). Plazma se stavlja u ispitne epruvete i čuva na – 20 °C do analize vitelogenina ili ostalih proteina koji mogu biti od interesa.

Postupak 3.B: zebrica, uzimanje krvi punkcijom srca

Kako bi se izbjeglo zgrušavanje krvi i propadanje proteina, uzorci se uzimaju u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom koja sadržava heparin (1 000 jedinica/ml) i aprotinin (inhibitor proteaze) (2 TIU/ml). Kao sastojci za pufer preporučuju se amonijev heparin i liofilizirani aprotinin. Za uzimanje uzorka krvi preporučuje se šprica (1 ml) s fiksnom tankom iglom (primjerice Braun Omnikan-F). Špricu je potrebno prethodno napuniti puferom (približno 100 µl) kako bi se iz svake ribe u potpunosti eluirale male količine krvi. Uzorci krvi uzimaju se punkcijom srca. Ribi je prvo potrebno dati anestetik MS-222 (100 mg/l). Pri odgovarajućem stupnju anestezije korisnik može razlikovati otkucaje srca zebrice. Pri punkciji srca klip šprice treba biti blago napet. Izvađene količine krvi kreću se od 20 do 40 mikrolitara. Nakon punkcije srca smjesu krvi i pufera potrebno je staviti u ispitnu epruvetu. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem (20 minuta; 5 000 g) i do analize čuva na – 80 °C.

Postupak 3.C: SOP: zebrica, homogenizacija glave i repa

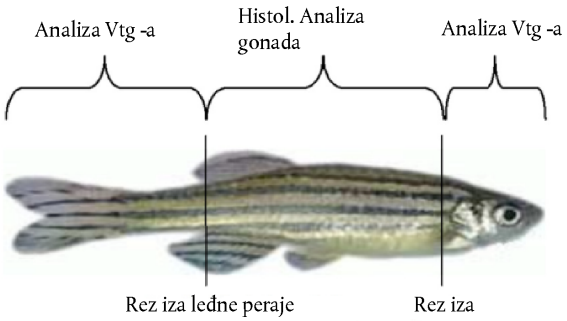
(1) Ribe se anesteziraju i usmrćuju u skladu s opisom ispitivanja.

(2) Glava i rep režu se u skladu sa slikom 1.

Važno: Sve instrumente za seciranje i podlogu za rezanje potrebno je pravilno isprati i očistiti (primjerice 96-postotnim etanolom) između rukovanja svakom ribom kako bi se spriječilo da ženke ili inducirani mužjaci kontaminiraju neinducirane mužjake vitelogeninom.

▼**M6**

Slika 1.



(1) Težina odrezane glave i repa svake ribe mjeri se do najbližeg mg.

(2) Dijelovi se nakon vaganja stavljaju u odgovarajuće epruvete (primjerice Eppendorfove epruvete od 1,5 ml) i zamrzavaju na – 80 °C do homogenizacije ili izravno homogeniziraju na ledu s pomoću dvaju plastičnih tučaka. (Ostale se metode mogu primjenjivati ako se provode na ledu, a rezultat je homogena smjesa). Važno: Epruvete je potrebno pravilno označiti brojevima kako bi se glava i rep mogli povezati s pripadajućim tijelom koje se upotrebljava za histologiju gonade.

(3) Kad se dobije homogena smjesa, dodaje se (težinski) četiri puta toliko zamrznutog pufera za homogenizaciju (*). Nastavite raditi s tučcima dok smjesa ne postane homogena. Važna napomena: Za svaku se ribu upotrebljavaju novi tučci.

(4) Uzorci se stavljaju na led do centrifugiranja na 4 °C pri 50 000 × g 30 minuta.

(5) Pipetom stavite 20 µl supernatanta u najmanje dvije epruvete tako da vrh pipete umočite ispod površinskog sloja masti i pažljivo usišite supernatant bez masti ili dijelova taloga.

(6) Epruvete se do upotrebe čuvaju na – 80 °C.

(*) **Homogenizacijski pufer:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-postotni koktel inhibitora proteaze (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktela inhibitora proteaze.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), primjerice proizvođača Bie & Berntsen, Danska.

— Koktel inhibitora proteaze: proizvođača Sigma (za tkivo sisavaca), broj proizvoda P 8340.

— *Napomena:* Homogenizacijski pufer treba upotrijebiti na dan proizvodnje. Tijekom upotrebe držite na ledu.

▼**M6**

Dodatak 7.

Uzorci s pojačanom razinom vitelogenina i referentni standard među testovima

Svakog dana provođenja testova vitelogenina analizirat će se uzorak s pojačanom razinom izrađen s pomoću referentnog standarda među testovima. Vitelogenin za izradu referentnog standarda među testovima bit će iz različite serije od one za izradu standarda kalibracije za provođenje testa.

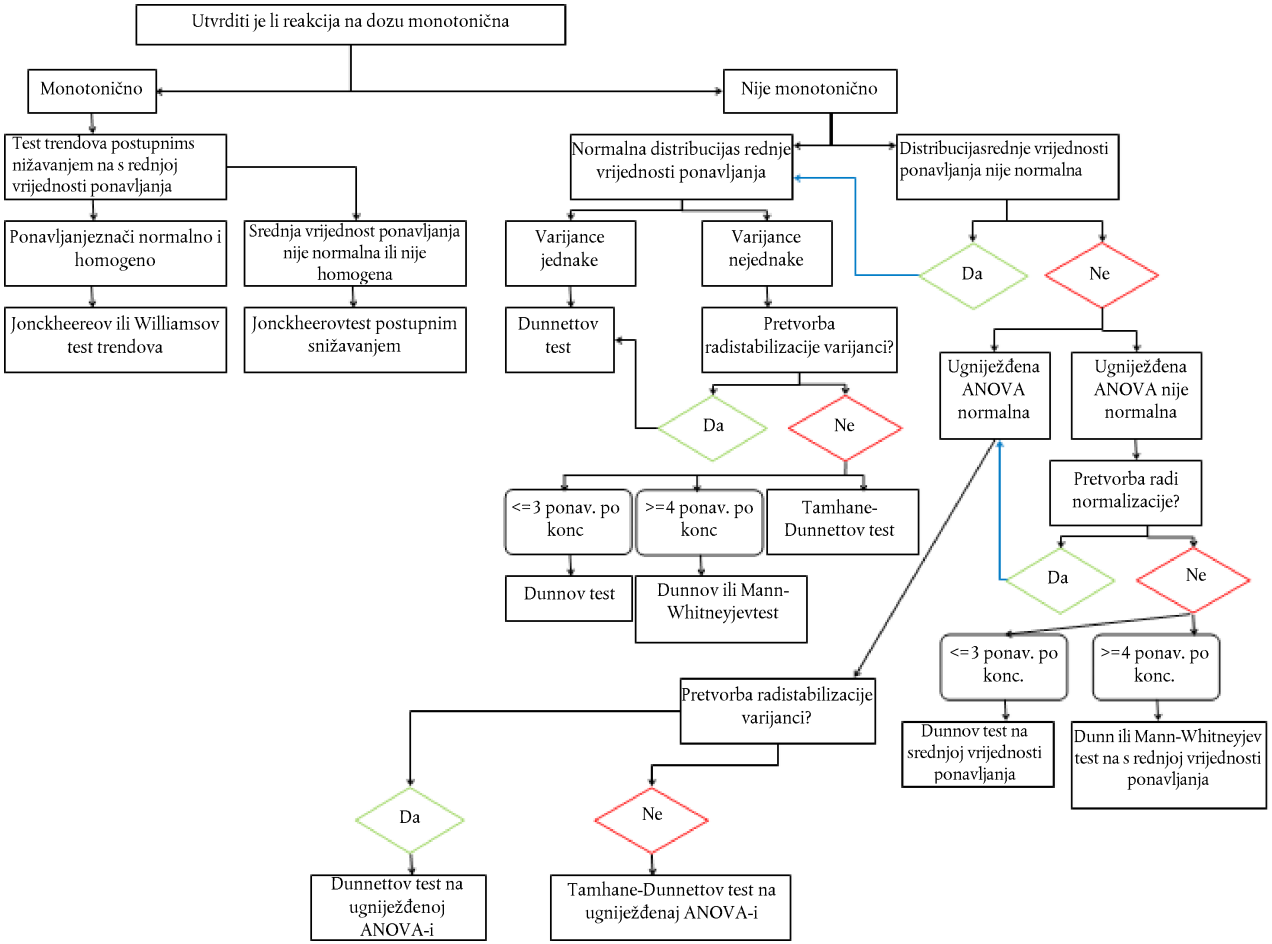
Uzorak s pojačanom razinom izradit će se dodavanjem poznate količine standarda među testovima uzorku plazme kontrolnih mužjaka. Uzorak se pojačava radi postizanja koncentracije vitelogenina koja je od 10 do 100 puta veća od očekivane koncentracije vitelogenina kontrolnih mužjaka riba. Uzorak plazme kontrolnih mužjaka koji se pojačava može potjecati od jedne ribe ili nekoliko riba.

Poduzorak nepojačane plazme kontrolnih mužjaka analizirat će se u najmanje dvije dvostruke jažice. I pojačani uzorak analizirat će se u najmanje dvije dvostruke jažice. Srednja količina vitelogenina iz dva nepojačana uzorka plazme kontrolnih mužjaka dodat će se izračunanoj količini vitelogenina koja je dodana uzorcima s pojačanom razinom; na taj se način određuje očekivana koncentracija. Omjer te očekivane i izmjerene koncentracije bilježit će se uz rezultate svakog kompleta testova provedenog tog dana.

▼M6

Dodatak 8.

Grafikon odluke za statističku analizu



02008R0440 — HR — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. ANALIZA METAMORFOZE VODOZEMACA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 213 (2009.). Potreba za razvojem i potvrdom analize kojom se mogu otkriti aktivne kemikalije u tiroidnom sustavu kralježnjaka potječe iz zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu izazvati štetne učinke na ljude i na životinjski svijet. U 1998. OECD je započeo djelovanje visokog prioriteta radi revizije postojećih Smjernica za ispitivanje te radi razvoja novih Smjernica za preventivno ispitivanje i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača. Jedan od elementa aktivnosti bilo je razvijanje Smjernice za preventivno ispitivanje kemikalija koje djeluju na tiroidni sustav kralježnjaka. Predloženo je i poboljšanje 28-dnevnog ispitivanja oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponavljanih doza (Poglavlje B.7 ovog Priloga) i analize metamorfoze vodozemaca (AMA). Poboljšana ispitna metoda B.7 podvrgnuta je validaciji i izdana je revidirana ispitna metoda. Analiza metamorfoze vodozemaca (AMA) bila je podvrgnuta opsežnom programu validacije koji je uključivao intralaboratorijske i interlaboratorijske studije kojima su dokazane relevantnost i pouzdanost analize (1., 2.). Nakon toga validacija analiza bila je predmet recenzije skupine nezavisnih stručnjaka (3.). Ova ispitna metoda rezultat je iskustva stečenog tijekom validacijskih studija za otkrivanje kemikalija koje aktivno djeluju na štitnjaču i rada obavljenog na drugim mjestima u zemljama članicama OECD-a.

NAČELO ISPITIVANJA

2. Analiza metamorfoze vodozemaca (AMA) jest preventivna analiza namijenjena empirijskoj identifikaciji kemikalija koje mogu ometati normalnu funkciju osovine hipotalamus-hipofiza-štitnjača (HPT). AMA predstavlja opći model kralježnjaka u onoj mjeri u kojoj se temelji na očuvanim strukturama i funkcijama HPT osovine. To je važna analiza jer metamorfoza vodozemaca pruža dobro proučavan proces ovisan o štitnjači, koji reagira na kemikalije aktivne u okviru HPT osovine te je jedina postojeća analiza kojom se otkriva aktivnost štitnjače u životinje koja prolazi morfološki razvoj.

3. Opći plan pokusa podrazumijeva izlaganje 51. stadija *Xenopus laevis* punoglavaca najmanje trima različitim koncentracijama ispitivane kemikalije i kontroli s vodom za razrjeđenje za 21 dan. Postoje četiri ponavljanja svake ispitne obrade. Gustoća ličinaka na početku ispitivanja jest 20 punoglavaca po ispitnom spremniku za sve skupine obrade. Krajnji učinci promatranja jesu duljina stražnjih udova, duljina od vrha njuške do kloake (SVL), stadij razvoja, mokra masa, histologija štitnjače te svakodnevno promatranje smrtnosti.

OPIS METODE

Ispitne vrste

4. *Xenopus laevis* rutinski se uzgaja u laboratorijima diljem svijeta i lako ju je nabaviti od komercijalnih dobavljača. Razmnožavanje ove vrste može se lako potaknuti cijele godine primjenom injekcija humanog korionskog gonadotropina (hCG) i rezultirajuće ličinke mogu se rutinski uzgajati do odabranih stadija razvoja u velikom broju kako bi se omogućila upotreba

▼M6

ispitnih protokola po određenim stadijima. Poželjno je da ličinke koje se upotrebljavaju u analizi potječu od odraslih jedinaka uzgojenih u laboratoriju. Kao druga mogućnost, iako to nije poželjan postupak, jajašca ili embriji mogu se poslati u laboratorij koji obavlja ispitivanja i može im se dopustiti da se aklimatiziraju; slanje u stadiju razvoja ličinke za upotrebu u ispitivanju neprihvatljivo je.

Oprema i potrepštine

5. Za obavljanje ove analize potrebna je sljedeća oprema i potrepštine:

a) sustav izlaganja (vidi opis u nastavku);

b) akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika (vidi opis u nastavku);

c) posude za uzgoj;

d) uređaji za kontroliranje temperature (npr. grijači ili hladnjaci (podesivi na 22 °± 1 °C));

e) termometar;

f) binokularni mikroskop za seciranje;

g) digitalni fotoaparat s najmanje četirima megapikselima razlučivosti i mikrofunkcijom;

h) softver za digitalizaciju slike;

i) Petrijeva zdjelica (npr. 100 × 15 mm) ili prozirna plastična posuda usporedive veličine;

j) analitička vaga s mogućnošću očitavanja do triju decimalnih mjesta (mg);

k) mjerač otopljenog kisika;

l) mjerač pH-vrijednosti;

m) mjerač intenziteta svjetlosti s mogućnošću mjerenja u luksima;

n) razne laboratorijske staklene posude i alati;

o) podesive pipete (od 10 do 5 000 µl) ili razne pipete odgovarajućih veličina;

p) ispitivana kemikalija u dostatnim količinama za provođenje studije, po mogućnosti od jedne serije;

q) analitički instrumenti prikladni za kemikaliju na ispitivanju ili ugovorene analitičke usluge.

Kemijska ispitljivost

6. AMA se temelji na protokolu vodenog izlaganja, pri čemu se ispitivana kemikalija uvodi u ispitne posude preko protočnog sustava. Međutim, protočnim metodama uvode se ograničenja na vrste kemikalija koje se mogu ispitati, kako je određeno fizikalno-kemijskim svojstvima kemikalije. Stoga, prije upotrebe ovog protokola potrebno je dobiti osnovne podatke o kemikaliji koja je bitna za određivanje ispitljivosti i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a o ispitivanju toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (4). Značajke koje ukazuju na to da može biti teško ispitati kemikaliju u vodenim sustavima uključuju: visoke koeficijente razdjeljenja oktanol/voda (log K_{ow}), visoku hlapljivost, osjetljivost na hidrolizu i osjetljivost na

▼M6

fotolizu u laboratorijskim uvjetima okolnog osvjetljenja. Ostali faktori mogu biti jednako tako važni za određivanje ispitljivosti i potrebno ih je utvrditi za svaki slučaj zasebno. Ako uspješno ispitivanje nije moguće za kemikaliju primjenom protočnog sustava ispitivanja, može se upotrebljavati statički sustav s obnavljanjem. Ako nijedan sustav ne može prihvatiti ispitivanu kemikaliju, onda se podrazumijeva da se tu kemikaliju neće ispitivati s pomoću ovog protokola.

Sustav izlaganja

7. Protočnom sustavu razrjeđivanja daje se prednost nad statičkim sustavom s obnavljanjem. Ako fizička i/ili kemijska svojstava bilo kojeispitivane kemikalije nisu prikladna za protočni sustav razrjeđivanja, tada se može primijeniti alternativni sustav izlaganja (npr. statički sustav s obnavljanjem). Sustavne komponente trebaju imati komponente koje su u dodiru s vodom od stakla, nehrđajućeg čelika i/ili politetrafluoroetilena. Međutim, mogu se upotrebljavati prikladni plastični materijali ako se time ne ugrožava studija. Spremnici za izlaganja trebali bi biti akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika, opremljeni cijevnim nastavcima koji rezultiraju približnim volumenom spremnika između 4,0 i 10,0 litara i minimalnom dubinom vode od 10 do 15 cm. Sustav bi trebao moći podržati sve koncentracije izlaganja i kontrolu s četirima ponavljanjima po obradi. Brzina protoka za svaki spremnik trebala bi biti konstantna s obzirom na održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikalije (npr. 25 ml/min). Spremnike za obradu potrebno je nasumice rasporediti na položaj u sustavu izlaganja kako bi se smanjili potencijalni učinci položaja, uključujući manja odstupanja temperature, intenziteta svjetlosti itd. Fluorescentnu rasvjetu potrebno je upotrebljavati za dobivanje fotoperioda od 12 sati svjetla: 12 sati mraka uz intenzitet koji varira od 600 do 2 000 luksa (lumen/m^2) na površini vode. Temperaturu vode potrebno je održavati na 22 ° ± 1 °C, pH-vrijednost održavati između 6,5 i 8,5, a koncentraciju otopljenog kisika (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % zasićenosti kisikom) u svakom ispitnom spremniku. Kao minimalnu temperaturu vode, pH-vrijednost i otopljeni kisik potrebno je mjeriti tjedno; poželjno je stalno mjeriti temperaturu u najmanje jednoj ispitnoj posudi. U Dodatku 1. navode se pokusni uvjeti u skladu s kojima je potrebno izvršiti protokol. Za daljnje informacije o postavljanju protočnih sustava izlaganja i/ili statičkih sustava s obnavljanjem vidi Standardni vodič za provođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima s ribama, makrobeskralježnjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (5) i opća toksikološka ispitivanja vode.

Kakvoća vode

8. Može se upotrebljavati bilo koja lokalno dostupna voda (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana aktivnim ugljenom) koja omogućava normalan rast i razvoj punoglavaca *X. Laevis*. Budući da se kakvoća lokalne vode može znatno razlikovati od jednog do drugog područja, potrebno je provesti analizu kakvoće vode, pogotovo ako nisu dostupni povijesni podaci o korisnosti vode za uzgoj *Xenopusa*. Posebno se treba pobrinuti da je voda bez bakra, klora i kloramina, koji su svi toksični za žabe i punoglavce. Nadalje se preporučuje analizirati vodu u vezi s pozadinskim razinama fluorida, perklorata i klorata (nusproizvodi dezinfekcije

▼M6

vode za piće) s obzirom na to da su svi ovi anioni supstrati nosača joda štitnjače i povećane razine svakog od ovih aniona mogu poremetiti rezultate studije. Analizu je potrebno obaviti prije početka ispitivanja, a ispitna voda obično ne bi trebala sadržavati te anione.

Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

9. Kako bi štitnjača sintetizirala TH, ličinkama treba biti dostupna dovoljna količina jodida putem kombinacije vode i prehrambenih izvora. Trenutačno ne postoje empirijski dobivene smjernice za minimalne koncentracije jodida. Međutim, dostupnost jodida može utjecati na reakciju tiroidnog sustava na aktivna sredstva i poznato je da modulira bazalnu aktivnost štitnjače, što je aspekt koji zaslužuje pozornost prilikom tumačenja rezultata histopatologije štitnjače. Dakle, potrebno je zabilježiti izmjerene koncentracije jodida u vodi iz ispitne vode. Na temelju dostupnih podataka iz validacijskih studija pokazalo se da protokol dobro funkcionira kada se koncentracije jodida (I-) ispitne vode kreću u rasponu između 0,5 i 10 ug/l. U idealnom slučaju minimalna koncentracija jodida u ispitnoj vodi trebala bi biti 0,5 µg/l. Ako se ispitna voda pomiješa s deioniziranom vodom, potrebno je dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 µg/l. U izvješću je potrebno navesti sva naknadna dodavanja joda ili drugih soli ispitnoj vodi.

Držanje životinja

Njega i uzgoj odraslih životinja

10. Njega i uzgoj odraslih životinja provode se u skladu sa standardnim smjernicama, a za detaljnije informacije čitatelja se upućuje na standardni vodič za obavljanje analize teratogeneze embrija žabe (FETAX) (6). Takvim standardnim smjernicama daje se primjer odgovarajuće njege i uzgojnih metoda, ali strogo pridržavanje nije potrebno. Kako bi se potaknuo uzgoj, parovima (3 – 5) odraslih ženki i mužjaka ubrizgava se humani korionski gonadotropin (hCG). Ženskim i muškim primjercima ubrizgava se oko 800 IU-1 000 IU i 600 IU-800 IU hCG-a otopljenog u 0,6 – 0,9 % slane otopine. Uzgojni parovi drže se u velikim spremnicima, neometano i pod statičkim uvjetima radi poticanja ampleksusa (vanjske oplodnje). Dno svakog spremnika za parenje trebalo bi imati lažno dno od nehrđajućeg čelika ili plastične mrežice, koja omogućava da mase jajašaca padnu na dno spremnika. Žabe kojima je hCG ubrizganu kasnim poslijepodnevnim satima obično će položiti većinu svojih jajašaca do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon izbacivanja i oplodnje dovoljne količine jajašaca potrebno je ukloniti odrasle životinje iz spremnika za uzgoj.

Njega i odabir ličinaka

11. Nakon uklanjanja odraslih životinja iz spremnika za uzgoj jajašca se skupljaju i ocjenjuje se njihova sposobnost preživljavanja na reprezentativnoj podskupini embrija iz svih spremnika za uzgoj. Najbolju pojedinačnu ikru, ili više njih, (preporučuje se 2 – 3 za procjenu kvalitete ikre) potrebno je zadržati na temelju sposobnosti preživljavanja embrija i prisutnosti odgovarajućeg broja (minimalno 1 500) embrija. Svi organizmi koji se upotrebljavaju u istraživanju trebali bi potjecati iz jednog mriještenja (tj. ikre se ne smiju miješati). Embriji se prebacuju u veliku ravnu zdjelu ili posudu, a sva očito mrtva ili nenormalna jajašca (vidi definiciju pod (5)) uklanjaju se s pomoću pipete ili kapaljke. Zdravi embriji iz svakog od triju mrijestova prenose se u tri odvojena spremnika za izleganje. Četiri dana nakon stavljanja u spremnike za izlijeganje odabire se najbolji mrijest na temelju sposobnosti preživljavanja i uspjeha izlijeganja, a ličinke se prenose u odgovarajući broj spremnika za uzgoj na 22° ± 1 °C. Osim toga, dodatne ličinke sele se u posebne spremnike za upotrebu kao zamjena u slučaju pojave smrtnosti u spremnicima za uzgoj tijekom prvog tjedna. Ovim postupkom održava se konzistentna gustoća organizma i time se smanjuju razvojna odstupanja u skupini jednog mrijesta. Sve

▼M6

spremnike za uzgoj potrebno je čistiti svakodnevno. Kao mjeru opreza poželjnije je upotrebljavati vinilne ili nitrilne rukavice nego gumene rukavice. Uginule ličinke potrebno je ukloniti svakodnevno i nadomjestiti zamjenskim ličinkama kako bi se održala gustoća organizama u prvom tjednu. Hranjenje se vrši najmanje dvaput dnevno.

12. Tijekom faze prije izlaganja punoglavci se prilagođavaju uvjetima stvarne faze izlaganja, uključujući vrstu hrane, temperaturu, ciklus svjetla i mraka te hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Stoga se preporučuje upotreba iste kulture/vode za razrjeđivanje tijekom faze prije izlaganja i faze izlaganja. Ako se upotrebljava sustav statične kulture za održavanje punoglavaca tijekom faze prije izlaganja, hranjivu podlogu za uzgoj kulture potrebno je potpuno zamijeniti najmanje dvaput tjedno. Naguravanje prouzročeno velikom gustoćom ličinaka u razdoblju prije izlaganja potrebno je izbjegavati jer takvi učinci mogu znatno utjecati na razvoj punoglavaca u sljedećoj fazi ispitivanja. Stoga gustoća uzgoja ne smije prelaziti oko četiri punoglavaca po litri hranjive podloge (sustav statičnog izlaganja) ili deset punoglavaca po litri hranjive podloge (s npr. 50 ml/min brzine protoka u sustavu prije izlaganja ili sustavu uzgoja). U tim uvjetima punoglavci bi se trebali razviti iz 45./46. stadija do 51. stadija u roku od dvanaest dana. Reprezentativne punoglavce ove matične populacije potrebno je pregledati svakodnevno zbog stadija razvoja kako bi se procijenila odgovarajuća vremenska točka za početak izlaganja. Potrebno je paziti da se stres i trauma u punoglavaca svedu na najmanju moguću mjeru, pogotovo za vrijeme kretanja, čišćenja akvarija i rukovanja ličinkama. Potrebno je izbjegavati stresne uvjete/aktivnosti kao što su glasna i/ili neprekidna buka, tapkanje po akvariju, vibracije u akvariju, prekomjerna aktivnost u laboratoriju i brze promjene sastavnica okoliša (dostupnost svjetla, temperatura, pH-vrijednost, DO, brzine protoka vode itd.). Ako se punoglavci ne razviju do 51. stadija u roku od 17 dana nakon oplodnje, prekomjerni stres potrebno je smatrati potencijalnim krivcem.

Hranjiva podloga i ishrana ličinaka

13. Punoglavci se hrane npr. hranom za punoglavce koja je komercijalno dostupna i upotrebljava se u validacijskim studijama (vidi i Dodatak 1.) tijekom razdoblja prije izlaganja (nakon Nieuwkoop i Faberova (NF) 45./46. stadija (8)) i tijekom cijelog 21-dnevnog razdoblja ispitivanja ili drugom hranom za koju se pokazalo da pruža jednaku uspješnost analize metamorfoze vodozemaca. Režim hranjenja u razdoblju prije izlaganja potrebno je pažljivo prilagoditi kako bi se zadovoljile potrebe punoglavaca u razvoju. Prema tome, potrebno je osigurati male porcije hrane novo izleglim punoglavcima nekoliko puta dnevno (najmanje dvaput). Višak hrane potrebno je izbjegavati kako bi se *i)* zadržala kakvoća vode i *ii)* spriječilo začepljenje filtera česticama hrane i organskim otpacima. Za hranu za punoglavce koja se upotrebljava u validacijskim studijama, dnevne porcije potrebno je povećati s rastom punoglavca do otprilike 30 mg po životinji na dan neposredno prije početka ispitivanja. Validacijske studije pokazale su da se ovom komercijalno dostupnom hranom podržava

▼M6

pravilan rast i razvoj punoglavaca *X. Laevis*. To je fina čestica koja ostaje lebdjeti u vodenom stupcu dugo vremena i ispire se protokom vode. Ukupnu dnevnu količinu hrane stoga je potrebno podijeliti na manje porcije i upotrijebiti za hranjenje najmanje dvaput dnevno. Za ovu hranu režim hranjenja naveden je u tablici 1. Potrebno je zabilježiti količine hranjenja. To može biti suha hrana ili kao radna otopina pripremljena u vodi za razrjeđivanje. Takvu radnu otopinu potrebno je pripremiti svježu svaki drugi dan i spremiti na 4 °C kada se ne upotrebljava.

Tablica 1.

Režim hranjenja s hranom za punoglavce koja je komercijalno dostupna i koja se upotrebljava u validacijskim studijama za punoglavce *X. Laevis* tijekom dijela životnog ciklusa AMA-e u protočnim uvjetima

Dan istraživanja	Porcija hrane (mg hrane / životinja / dan)
0. – 4.	30
5. – 7.	40
8. – 10.	50
11. – 14.	70
15. – 21.	80

Analitička kemija

14. Prije provođenja studije stabilnost ispitivane kemikalije potrebno je ocijeniti primjenom postojećih podataka o njezinoj topljivosti, razgradivosti i volatilnosti. Ispitne otopine iz svakog ponavljanja pri svakoj koncentraciji potrebno je uzorkovati za analitičke kemijske analize na početku ispitivanja (dan 0) i jednom tjedno tijekom ispitivanja za najmanje četiri uzorka. Preporučuje se i da se svaka ispitna koncentracija analizira tijekom pripreme sustava, prije početka ispitivanja, kako bi se provjerila učinkovitost sustava. Osim toga, preporučuje se analizirati radne otopine kada se mijenjaju, pogotovo ako se volumenom radne otopine ne osiguraju dovoljne količine kemikalije koja će obuhvatiti trajanje razdoblja rutinskog uzorkovanja. U slučaju kemikalija koje se ne mogu otkriti u nekima ili svim koncentracijama upotrijebljenih u ispitivanju, radne otopine potrebno je mjeriti i brzine protoka sustava zabilježiti kako bi se izračunale nazivne koncentracije.

Uvođenje kemikalije

15. Metoda koja se upotrebljava za uvođenje ispitivane kemikalije u sustav može varirati ovisno o njezinim fizikalno-kemijskim svojstvima. Kemikalije topljive u vodi mogu se otopiti u alikvotima ispitne vode pri koncentraciji pri kojoj je moguća isporuka ciljane ispitivane koncentracije u protočnom sustavu. Kemikalije koje su u tekućem stanju na sobnoj temperaturi i djelomično topljive u vodi mogu se uvesti primjenom metoda za miješanje dviju tekućina do zasićenosti. Kemikalije koje su u krutom stanju na sobnoj temperaturi i djelomično topljive u vodi mogu se uvesti s pomoću kolone za zasićivanje od staklene vune (7). Prednost se daje upotrebi sustava ispitivanja bez nosača, međutim, različite ispitivane kemikalije imat će raznolika fizikalno-kemijska svojstva koja će vjerojatno zahtijevati različite pristupe za pripremu vode za izlaganje kemikaliji. Poželjno je uložiti napor u izbjegavanje otapala ili nosača jer: *i)* određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih endokrinoloških reakcija, *ii)* ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može

▼M6

dovesti do pogrešnih određivanja učinkovitih koncentracija te *iii)* upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja „biofilma" povezanog s mikrobiološkom aktivnošću. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a o ispitivanju toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (4) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Izbor otapala odredit će se kemijskim svojstvima kemikalije. Otapala za koje je utvrđeno da su učinkovita za ispitivanje toksičnosti u vodi uključuju aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. U slučaju da se upotrebljava otapalo nosač, koncentracije otapala trebale bi biti ispod kronične najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC); Smjernicom OECD-a predlaže se maksimalno 100 ul/l; najnovijim pregledom preporučuje se upotreba koncentracija otapala nižih od 20 ul/l vode za razrjeđivanje (12). Ako se upotrebljavaju otapala nosači, osim kontrolnih skupina s neotapalom (čista voda), potrebno je ocijeniti odgovarajuće kontrolne skupine s otapalom. Ako kemikaliju nije moguće primijeniti kroz vodu bilo zbog fizikalno-kemijskih svojstava (slabe topljivosti) bilo zbog ograničene dostupnosti kemikalije, može se razmotriti njezino uvođenje kroz hranu. Preliminarni radovi provedeni su na izlaganjima putem hrane; međutim, ovaj način izlaganja obično se ne upotrebljava Izbor metode potrebno je dokumentirati i analitički provjeriti.

Izbor ispitnih koncentracija

Utvrđivanje visoke ispitne koncentracije

16. Za potrebe ovog ispitivanja visoke ispitne koncentracije potrebno je utvrditi granicom topljivosti ispitivane kemikalije; najviša prihvatljiva koncentracija (MTC) za akutno toksične kemikalije; ili 100 mg/l, ovisno o tome koja je najniža.

17. MTC se definira kao najviša ispitna koncentracija kemikalije, koja izaziva manje od 10 % smrtnosti od kroničnih bolesti. Upotrebom ovog pristupa podrazumijeva se da već postoje empirijski podaci o smrtnosti od kroničnih bolesti iz kojih se može procijeniti MTC. Procjena MTC-a može biti netočna i obično je potrebno stručno mišljenje. Iako upotreba regresijskih modela može biti tehnički najzdraviji pristup procjene MTC-a, korisna srednja vrijednost MTC-a može se dobiti iz postojećih podataka o akutnim stanjima s pomoću 1/3 akutne vrijednosti LC_{50}. Međutim, podaci o akutnoj toksičnosti mogu nedostajati za vrste na ispitivanju. Ako podaci o akutnoj toksičnosti specifični za određenu vrstu nisu dostupni, tada se 96-satno ispitivanje s pomoću LC_{50} može dovršiti s punoglavcima koji su predstavnici (tj. isti stadij) onih na ispitivanju u AMA-i. Fakultativno, ako su dostupni podaci o drugim vodenim vrstama (npr. studije LC50 u riba ili drugih vodozemaca), tada se može upotrebljavati stručno mišljenje da bi se procijenio mogući MTC temeljem ekstrapolacije vrsta.

18. Kao druga mogućnost, ako kemikalija nije akutno toksična i ako je topljiva iznad 100 mg/l, tada je 100 mg/l potrebno smatrati kao najvišu ispitnu koncentraciju (HTC) s obzirom na to da se ova koncentracija obično smatra „praktički netoksičnom".

▼M6

19. Iako to nije preporučeni postupak, statičke metode s obnavljanjem mogu se upotrebljavati ako protočne metode nisu dovoljne za postizanje MTC-a. Ako se upotrebljavaju statičke metode s obnavljanjem, tada je stabilnost koncentracije ispitivane kemikalije potrebno dokumentirati i zadržati unutar granica kriterija učinkovitosti. Preporučuju se 24-satna razdoblja obnavljanja. Razdoblja obnavljanja koja prelaze 72 sata nisu prihvatljiva. Osim toga, parametre kakvoće vode (npr. DO, temperatura, pH-vrijednost itd.) potrebno je mjeriti na kraju svakog razdoblja obnavljanja, neposredno prije obnavljanja.

Raspon ispitne koncentracije

20. Potrebne su *najmanje* tri ispitne koncentracije i kontrola s čistom vodom (i kontrola s nosačem prema potrebi). Najmanja razlika ispitne kemikalije između najviše i najniže trebala bi biti oko jedan red veličine. Najveća je podjela doze 0,1, a najmanja je 0,33.

POSTUPAK

Početak i provođenje ispitivanja

0. dan

21. Izlaganje bi trebalo započeti kada je dovoljan broj punoglavaca u matičnoj populaciji prije izlaganja dostigao 51. stadij razvoja prema Nieuwkoopu i Faberu (8), a koji su manji ili jednaki 17 dana starosti nakon oplodnje. Za odabir pokusnih životinja zdrave punoglavce normalnog izgleda matične populacije potrebno je skupiti u jednu posudu koja sadržava odgovarajuću količinu vode za razrjeđivanje. Za određivanje stadija razvoja punoglavce je potrebno pojedinačno ukloniti iz spremnika za sakupljanje s pomoću male mreže ili sita i prenijeti u prozirnu mjernu posudu (npr. 100 mm Petrijeve zdjelice) koja sadržava vodu za razrjeđivanje. Za određivanje stadija poželjno je ne upotrebljavati anesteziju, međutim, pojedinačno se mogu anestezirati punoglavci s pomoću 100 mg/l trikain metansulfonata (npr. MS-222), koji je primjereno puferiran natrijevim bikarbonatom (pH-vrijednost 7,0) prije rukovanja. Ako se upotrebljava, od iskusnih laboratorija potrebno je dobiti metodologiju za primjerenu upotrebu npr. MS-222 za anesteziju i prijaviti s rezultatima ispitivanja. Životinjama je potrebno pažljivo rukovati tijekom ovog prijenosa kako bi se smanjio stres zbog rukovanja i kako bi se izbjegle ozljede.

22. Stadij razvoja životinja određuje se binokularnim mikroskopom za seciranje. Kako bi se smanjila krajnja promjenjivost u stadiju razvoja, ovo određivanje stadija važno je provesti što je moguće točnije. Prema Nieuwkoopu i Faberu (8) primarna razvojna oznaka za odabir 51. stadija organizama jest morfologija stražnjih udova. Morfološke karakteristike stražnjih udova potrebno je ispitati pod mikroskopom. Iako je za sveobuhvatne informacije o određivanju stadija punoglavaca potrebno proučiti cijeli Nieuwkoop i Faberov (8) vodič, stadij se može pouzdano odrediti s pomoću istaknutih morfoloških oznaka. Sljedeća tablica može se upotrebljavati za pojednostavnjivanje i standardiziranje procesa određivanja stadija tijekom studija prepoznavanjem tih istaknutih morfoloških oznaka povezanih s različitim stadijima, uz pretpostavku da je razvoj normalan.

▼M6

Tablica 2.

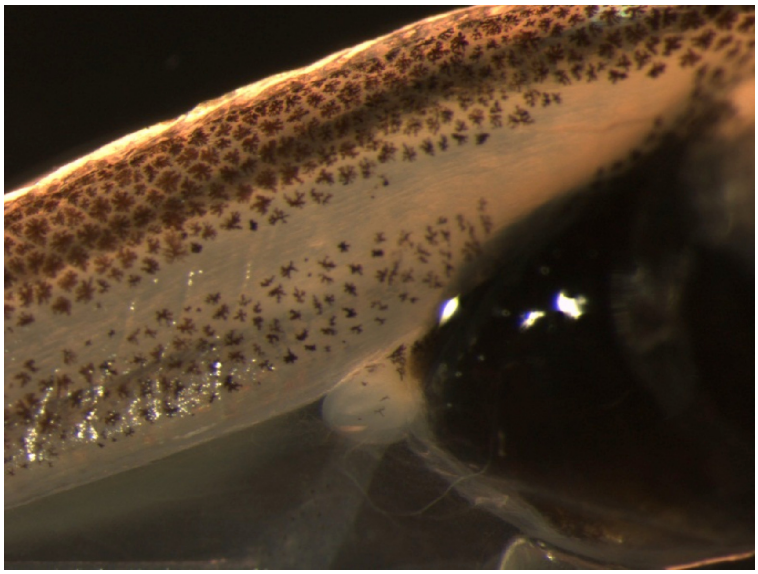
Istaknute morfološke oznake za određivanje stadija razvoja temeljem Neuwkoop i Faberovih smjernica.

Istaknute morfološke oznake	Stadij razvoja															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Stražnji udovi	X	X	X	X	X	X	X									
Prednji udovi						X	X	X	X	X						
Kraniofacijalna struktura										X	X	X	X			
Morfologija olfaktornog živca											X	X	X			
Duljina repa													X	X	X	X

23. Za početak ispitivanja svi punoglavci trebali bi biti u 51. stadiju. Najistaknutija morfološka oznaka za određivanje ovog stadija jest morfologija stražnjih udova, prikazana na slici 1.

Slika 1.

Morfologija stražnjih udova 51. stadija punoglavca X. Laevis.



24. Osim odabira stadija razvoja, može se odabrati fakultativna veličina pokusnih životinja. U tu svrhu potrebno je izmjeriti cijelu duljinu tijela (ne SVL) 0. dana za poduzorak od približno 20 NF punoglavaca 51. stadija. Nakon izračuna prosječne duljine cijelog tijela za ovu skupinu životinja mogu se postaviti najniže i najviše granične vrijednosti za duljinu cijelog tijela pokusnih životinja dopuštajući raspon srednje vrijednosti ± 3 mm (srednje vrijednosti raspona duljine cijelog tijela između 24,0 i 28,1 mm za punoglavce 51. stadija). Međutim, određivanje stadija razvoja jest primarni parametar u određivanju spremnosti svake pokusne životinje. Punoglavci u kojih su primijećene vrlo vidljive deformacije ili ozljede potrebno je isključiti iz ispitivanja.

▼M6

25. Punoglavci koji ispunjavaju prethodno navedene kriterije za određivanje stadija drže se u spremniku čiste vode iz koje je uklonjen klor dok se ne završi proces određivanja stadija. Nakon što se završi određivanje stadija, ličinke se nasumično raspoređuju na izlaganje u spremnike za obradu sve dok svaki spremnik ne sadržava 20 ličinaka. Zatim se u svakom spremniku za obradu provjeravaju životinje neuobičajenog izgleda (npr. ozljede, nenormalan način plivanja itd.). Punoglavce nezdravog izgleda potrebno je ukloniti iz spremnika za obradu i zamijeniti novo izabranim ličinkama iz spremnika za sakupljanje.

Opažanja

26. Za temeljitije informacije o postupcima za završetak ispitivanja i obrade punoglavaca pogledati Smjernicu OECD-a o histologiji štitnjače vodozemaca (9).

Mjerenja 7. dana

27. Sedmog dana uklanja se petoro nasumično odabranih punoglavaca iz svakog ispitnog spremnika. Upotrijebljen postupak nasumičnog odabira trebao bi pružiti svakom organizmu na ispitivanju jednaku vjerojatnost da bude izabran. To se može postići primjenom bilo koje metode nasumičnog odabira, ali potrebno je da svaki punoglavac bude umrežen. Punoglavci koji nisu odabrani vraćaju se u spremnike podrijetla, a odabrani punoglavci humano se usmrćuju s od 150 do 200 mg/l npr. MS-222, koji je primjereno puferiran natrijevim bikarbonatom kako bi se postigla pH-vrijednost od 7,0. Eutanazirani punoglavci ispiru se vodom i suše, nakon čega slijedi određivanje tjelesne težine do najbližeg miligrama. Za svakog punoglavca određuje se duljina stražnjih udova, duljina od vrha njuške do kloake i stadij razvoja (s pomoću binokularnog mikroskopa za seciranje).

Mjerenja 21. dana (završetak ispitivanja)

28. Po završetku ispitivanja (21. dan) preostali punoglavci uklanjaju se iz ispitnih spremnika i humano usmrćuju s od 150 do 200 mg/l npr. MS-222, koji je primjereno puferiran natrijevim bikarbonatom, kako je prethodno opisano. Punoglavci se ispiru vodom i suše, nakon čega slijedi određivanje tjelesne težine do najbližeg miligrama. Za svakog punoglavca mjeri se stadij razvoja, SVL i duljina stražnjih udova.

29. Sve ličinke smještaju se u Davidsonov fiksativ od 48 do 72 sata, bilo kao uzorci cijelog tijela bilo kao uzorci odrezanog tkiva glave koji sadržavaju donju čeljust za histološke procjene. Za histopatologiju ukupno pet punoglavaca potrebno je uzorkovati iz svakog ponavljanja. Budući da je visina folikularne stanica ovisna o stadiju (10), najprikladniji pristup uzorkovanja za histološke analize jest upotreba jedinaka poduranih stadija, kad god je moguće. Kako bi se odabrale jedinke podudarnih stadija, svim ličinkama prvo je potrebno odrediti stadij prije odabira i naknadne obrade radi prikupljanja i čuvanja podataka. To je potrebno jer će normalno odstupanje u razvoju rezultirati različitim podjelama po stadijima unutar svakog ponavljanja.

30. Životinje odabrane za histopatologiju (n = 5 iz svakog ponavljanja) potrebno je povezati sa srednjom stadijem kontrola (skupna ponavljanja), kad god je moguće. Ako postoje ponavljanja s više od pet ličinaka u odgovarajućem stadiju, tada se nasumično odabire pet ličinaka.

▼M6

31. Ako postoje ponavljanja s manje od pet ličinkaka u odgovarajućem stadiju, tada je nasumično odabrane jedinke iz sljedećeg nižeg ili višeg stadija razvoja potrebno uzorkovati da bi se dobila ukupna veličina uzorka od pet ličinaka po ponavljanju. Po mogućnosti odluku o uzorkovanju dodatnih ličinaka bilo iz sljedećeg nižeg ili višeg stadija razvoja potrebno je temeljiti na ukupnoj procjeni raspodjele po stadijima u kontrolnim i kemijskim obradama. To jest, ako je kemijska obrada povezana s usporavanjem razvoja, tada je potrebno uzorkovati dodatne ličinke iz sljedećeg nižeg stadija. S druge strane, ako je kemijska obrada povezana s ubrzavanjem razvoja, tada je potrebno uzorkovati dodatne ličinke iz sljedećeg višeg stadija.

32. U slučajevima ozbiljnih promjena razvoja punoglavca uslijed tretiranja ispitivanom kemikalijom možda ne dođe do preklapanja raspodjele po stadijima u kemijskim obradama s izračunanim kontrolim srednjim stadijem razvoja. Samo u tim slučajevima postupak odabira potrebno je mijenjati koristeći se stadijem različitim od kontrolnog srednjeg stadija kako bi se postiglo uzorkovanje ličinaka podudarnih po stadijima za histopatologiju štitnjače. Nadalje, ako su stadiji neodređeni (tj. asinkronija), tada je potrebno nasumično odabrati pet punoglavaca iz svakog ponavljanja za histološku analizu. Objašnjenje predmetnog uzorkovanja bilo kojih ličinaka koje nisu u stadiju koji je jednak kontrolnom srednjem stadiju razvoja potrebno je prijaviti.

Utvrđivanje bioloških krajnjih učinaka

33. Tijekom 21-dnevne faze izlaganja mjerenje primarnih krajnjih učinaka provodi se 7. i 21. dana, međutim, pokusne životinje potrebno je svakodnevno promatrati. U tablici 3. nalazi se pregled mjerenja krajnjih učinaka i odgovarajućih vremenskih točaka promatranja. Detaljnije informacije o tehničkim postupcima za mjerenje apikalnih krajnjih učinaka i histoloških procjena dostupne su u smjernicama OECD-a (9).

Tablica 3.

Vremenske točke promatranja za primarne krajnje učinke u AMA-i.

Apikalni krajnji učinci	Svakodnevno	7. dan	21. dan
— Smrtnost	•		
— Stadij razvoja		•	•
— Duljina stražnjih udova		•	•
— Duljina od vrha njuške do kloake		•	•
— Mokra masa tijela		•	•
— Histologija štitnjače			•

▼M6

Apikalni krajnji učinci

34. Stadij razvoja, duljina stražnjih udova, SVL i mokra masa jesu apikalni krajnji učinci AMA-e i svaka je ukratko objašnjena u nastavku. Daljnje tehničke informacije za prikupljanje tih podataka dostupne su u navedenim smjernicama uključujući postupke za računalno potpomognute analize koje se preporučuju za upotrebu.

Stadij razvoja

35. Stadij razvoja punoglavca *X. laevis* određuje se s pomoću Nieuwkoop i Faberovih kriterija za određivanje stadija razvoja (8). Podaci o stadiju razvoja upotrebljavaju se kako bi se utvrdilo je li razvoj ubrzan, asinkron, zakašnjeli ili nepromijenjen. Ubrzani ili zakašnjeli razvoj određuje se usporedbom između srednjeg stadija postignutog u kontrolnim ili obrađenim skupinama. Asinkroni razvoj bilježi se kada ispitana tkiva nisu oštećena ili nenormalna, ali je relativni trenutak morfogeneze i razvoj različitih tkiva poremećen unutar pojedinog punoglavca.

Duljina stražnjih udova

36. Razlika i rast stražnjih udova pod kontrolom su hormona štitnjače i glavne su razvojne oznake već upotrijebljene u određivanju stadija razvoja. Razvoj stražnjih udova upotrebljava se kvalitativno u određivanju stadija razvoja, ali ovdje se razmatra kao kvantitativni krajnji učinak. Stoga se duljina stražnjih udova mjeri kao krajnji učinak za otkrivanje učinaka na osovinu štitnjače (slika 2.). Radi dosljednosti duljina stražnjih udova mjeri se na lijevom stražnjem udu. Duljina stražnjih udova ocjenjuje se i 7. i 21. dana ispitivanja. Mjerenje duljine stražnjih udova 7. dana jednostavno je, kao što je prikazano na slici 2. Međutim, mjerenje stražnjih udova 21. dana složenije je zbog pregiba na udovima. Stoga bi mjerenja duljine stražnjih udova 21. dana trebala polaziti od trbušne stijenke i pratiti srednju liniju udova kroz sva kutna odstupanja. Promjene u duljini stražnjih udova 7. dana, čak i ako nisu očite 21. dana, još uvijek se smatraju važnima za potencijalnu tiroidnu aktivnost. Mjerenja duljine dobivaju se iz digitalnih fotografija s pomoću softvera za analizu slike, kao što je navedeno u Smjernici OECD-a o histologiji štitnjače vodozemaca (9).

Duljina tijela i mokra masa

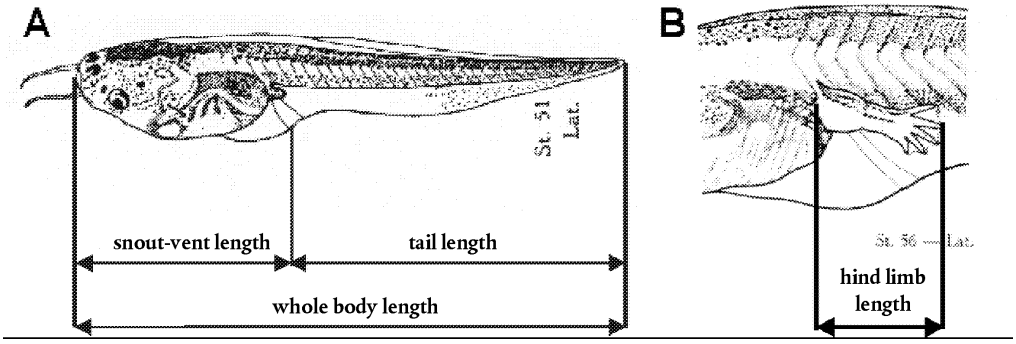
37. Određivanja duljine od vrha njuške do kloake (SVL) (slika 2.) i mokre mase uključena su u ispitni protokol kako bi se procijenili mogući učinci ispitivanih kemikalija na brzinu rasta punoglavaca u odnosu na kontrolnu skupinu te su korisni u otkrivanju opće toksičnosti ispitivane kemikalije. Budući da uklanjanje preostale vode za određivanja težine može izazvati stresne uvjete za punoglavce i dovesti do oštećenja kože, ta se mjerenja vrše 7. dana na poduzorkovanim punoglavcima, a u svih ostalih punoglavaca po završetku ispitivanja (21. dan). Zbog dosljednosti upotrebljava se kranijalni aspekt kloake kao repne granice mjerenja.

38. Duljina od vrha njuške do kloake (SVL) upotrebljava se za procjenu rasta punoglavaca, kao što je prikazano na slici 2.

▼M6

Slika 2.

(A) Vrste mjerenja duljine tijela i (B) Mjerenja duljine stražnjih udova za punoglavce X. laevis (1).



Histologija štitnjače

39. Dok su stadij razvoja i duljina stražnjih udova važni krajnji učinci za procjenu promjena povezanih s izlaganjem u metamorfološkom razvoju, kašnjenje u razvoju samo po sebi ne može se smatrati dijagnostičkim pokazateljem antitiroidne aktivnosti. Neke se promjene mogu uočiti samo rutinskom histopatološkom analizom. Dijagnostički kriteriji uključuju hipertrofiju/atrofiju štitnjače, hipertrofiju folikularnih stanica, hiperplaziju folikularnih stanica te kao dodatni kvalitativni kriterij: područje lumena folikule, kvaliteta koloida i visina/oblik folikularnih stanica. Stupanj ozbiljnosti (4. stupanj) potrebno je prijaviti. Informacije o dobivanju i obradi uzoraka za histološku analizu i obavljanje histoloških analizira na uzorcima tkiva dostupne su u „Analizi metamorfoze vodozemaca: Dio 1. – Tehničke smjernice za morfološko uzorkovanja i histološku pripremu” i „Analiza metamorfoze vodozemaca: Dio 2 – Pristup studijama, dijagnostičkim kriterijima, određivanju stupnja ozbiljnosti i atlasu” (9). Laboratoriji koji obavljaju analizu po prvi put trebali bi potražiti savjet iskusnih patologa u svrhu izobrazbe prije poduzimanja histološke analize i procjene štitnjače. Očite i znatne promjene apikalnih krajnjih učinaka koje ukazuju na ubrani razvoj ili asinhroniju mogu isključiti potrebu za obavljanjem histopatološke analize štitnjače. Međutim, nedostatak očitih morfoloških promjena ili dokaza o zakašnjelom razvoju potvrđuje histološke analize.

Smrtnost

40. Sve ispitne spremnike potrebno je provjeriti svakodnevno radi mrtvih punoglavaca i zabilježiti brojeve za svaki spremnik. Potrebno je zabilježiti datum, koncentraciju i broj spremnika za bilo koja promatranja smrtnosti. Mrtve životinje potrebno je ukloniti iz ispitnog spremnika čim se uoče. Stope smrtnosti veće od 10 % mogu ukazivati na neprimjerene uvjete ispitivanja ili toksične učinke ispitivane kemikalije.

Dodatna opažanja

41. Potrebno je zabilježiti slučajeve nenormalnog ponašanja i vrlo vidljivih deformacija i lezija. Potrebno je zabilježiti datum, koncentraciju i broj spremnika za bilo koja promatranja neuobičajenog ponašanja, velikih deformacija ili lezija. Normalno ponašanje punoglavaca karakterizira lebdenje u stupcu vode s repom povišenim iznad glave, redovito i ritmičko

▼M6

udaranje repne peraje, redovito izranjanje na površinu, operkulacija i reagiranje na podražaj. Neuobičajeno ponašanje uključilo bi npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaj. Osim toga, potrebno je zabilježiti velike razlike u potrošnji hrane između obrada. Grube malformacije i lezije mogu na primjer uključivati morfološke anomalije (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije, bakterijske ili gljivične infekcije. Ta su određivanja kvalitativna i potrebno ih je smatrati srodnim kliničkim znakovima bolesti/stresa i usporediti s kontrolnim životinjama. Ako je pojavljivanje ili brzina pojavljivanja veća u izloženim spremnicima nego u kontrolnima, tada ih je potrebno smatrati dokazom očite toksičnosti.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Prikupljanje podataka

42. Sve podatke potrebno je prikupiti elektroničkim ili ručnim sustavima, koji su u skladu s dobrom laboratorijskom praksom (GLP). Podaci o studiji trebali bi sadržavati:

Ispitivana kemikalija:

— Karakterizacija ispitivane kemikalije: fizikalno-kemijska svojstva; informacije o stabilnosti i biorazgradivosti;

— Informacije i podaci o kemikaliji: način i učestalost priprema razrjeđivanja. Informacije o ispitivanoj kemikaliji uključuju stvarne i nazivne koncentracije ispitivane kemikalije, a u nekim slučajevima nepolaznu kemikaliju ako je to prikladno. Mjerenja ispitivane kemikalije mogu biti potrebna za radne otopine, kao i za ispitne otopine;

— Otapalo (ako nije voda): obrazloženje izbora otapala i karakterizacija otapala (prirodno, koncentracije koje se upotrebljavaju);

Uvjeti ispitivanja:

— Radna evidencija: sastoji se od promatranja koja se odnose na funkcioniranje sustava ispitivanja te pratećeg okoliša i infrastrukture. Tipična evidencija uključuje: okolnu temperaturu, temperaturu ispitivanja, fotoperiod, status ključnih komponenata sustava izlaganja (npr. pumpe, brojači ciklusa, pritisci), brzine protoka, razine vode, promjene zaliha u bocama i evidenciju o hranjenju. Parametri opće kakvoće vode jesu: pH-vrijednost, DO, provodljivost, ukupan jod, lužnatost i tvrdoća;

— Odstupanja od ispitne metode: ove informacije trebale bi uključiti bilo koje informacije ili narativne opise odstupanja od ispitne metode;

Rezultati:

— Biološka promatranja i podaci: oni uključuju svakodnevna promatranja smrtnosti, potrošnju hrane, neuobičajen način plivanja, letargiju, gubitak ravnoteže, deformacije, lezije itd. Promatranja i podaci prikupljeni u unaprijed određenim razmacima uključuju: dob, duljinu stražnjih udova, duljinu od vrha njuška do kloake i mokru masu;

▼M6

— Statističko-analitičke tehnike i obrazloženje upotrijebljenih tehnika; rezultati statističke analize po mogućnosti u obliku tablice;

— Histološki podaci: uključuju narativne opise, kao i stupanj ozbiljnosti i rezultate učestalosti određenih promatranja, kao što je navedeno u smjernicama o histopatologiji;

— *Ad hoc* promatranja: ova promatranja trebala bi uključivati narativne opise studije koji se ne uklapaju u prethodno opisane kategorije.

Dostavljanje podataka

43. Dodatak 2. sadržava tablice o svakodnevnom prikupljanju podataka koje mogu poslužiti kao smjernica za unos neobrađenih podataka i za izračune statističkog sažetka. Osim toga, predviđene su izvještajne tablice koje su pogodne za priopćavanje sažetaka podataka o krajnjim učincima. Izvještajne tablice za histološke procjene mogu se pronaći u Dodatku 2.

Kriteriji učinkovitosti i prihvatljivost/valjanost ispitivanja

44. Općenito, velika odstupanja od ispitne metode rezultirat će neprihvatljivim podacima za tumačenje ili izvješćivanje. Stoga su sljedeći kriteriji u tablici 4. razvijeni kao smjernica za određivanje kvalitete obavljenog ispitivanja i opće učinkovitosti kontrolnih organizama.

Tablica 4.

Kriteriji učinkovitosti za AMA-u

Kriterij	Prihvatljive granice
Ispitne koncentracije	Održavane na ≤ 20 % CV (varijabilnost izmjerene ispitne koncentracije) preko 21 dana ispitivanja
Smrtnost u kontrolama	≤ 10 % – smrtnost u bilo kojem ponavljanju u kontrolama ne smije prelaziti dva punoglavca
Najmanja srednji stadij razvoja kontrola na kraju ispitivanja	57
Raspon stadija razvoja u kontrolnoj grupi	10. i 90. postotak distribucije stadija razvoja ne smije se razlikovati za više od četiri stadija
Otopljeni kisik	≥ 40 % zasićenosti kisikom (*)
pH-vrijednost	pH-vrijednost potrebno je održavati između 6,5 i 8,5. Razlike između ponavljanja / između obrada ne smiju biti veće od 0,5.
Temperatura vode	22° ± 1 °C – razlike između ponavljanja / između obrada ne smiju biti veće od 0,5 °C
Ispitne koncentracije bez očite toksičnosti	≥ 2
Učinkovitost ponavljanja	≤ 2 ponavljanja kroz ispitivanje može biti ugroženo

▼M6

Kriterij	Prihvatljive granice
Posebni uvjeti za upotrebu otapala	Ako se upotrebljava otapalo nosač, i kontrolnu skupinu s otapalom i kontrolnu skupinu s čistom vodom potrebno je upotrebljavati i zabilježiti rezultate
	Statistički značajne razlike između kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom obrađuju se posebno. Vidi u nastavku za više informacija
Posebni uvjeti za statički sustav s obnavljanjem	Potrebno je zabilježiti reprezentativne kemijske analize prije i poslije obnavljanja
	Razine amonijaka potrebno je izmjeriti odmah prije obnavljanja
	Sve parametre kakvoće vode navedene u tablici 1. Dodatka 1. potrebno je izmjeriti odmah prije obnavljanja
	Razdoblje obnavljanja ne smije biti dulje od 72 sata
	Primjereni raspored hranjenja (50 % dnevne porcije hrane za punoglavce koja je u komercijalnoj upotrebi)

(*) Dozračavanje vode može se održati putem pročišćivača. Preporučuje se postaviti pročišćivače na razinama koje ne stvaraju pretjeran stres na punoglavce.

Valjanost ispitivanja

45. Potrebno je ispuniti sljedeće uvjete da bi se ispitivanje smatralo prihvatljivim/važećim:

Važećim pokusom utvrđeno je da je test negativan na tiroidnu aktivnost:

(1) Za bilo koju navedenu obradu (uključujući kontrole) smrtnost ne smije prelaziti 10 %. Za bilo koje navedeno ponavljanje smrtnost ne smije biti veća od tri punoglavca, u protivnom se ponavljanje smatra kompromitirano.

(2) Najmanje dvije razine obrade sa sva četiri nekompromitirana ponavljanja trebala bi biti dostupna za analizu.

(3) Najmanje dvije razine obrade s jasnim znakovima toksičnosti trebale bi biti dostupne za analizu.

Važećim pokusom utvrđeno je da je test pozitivan na tiroidnu aktivnost:

(1) Može doći do smrtnosti najviše dva punoglavca/ponavljanja u kontrolnoj skupini.

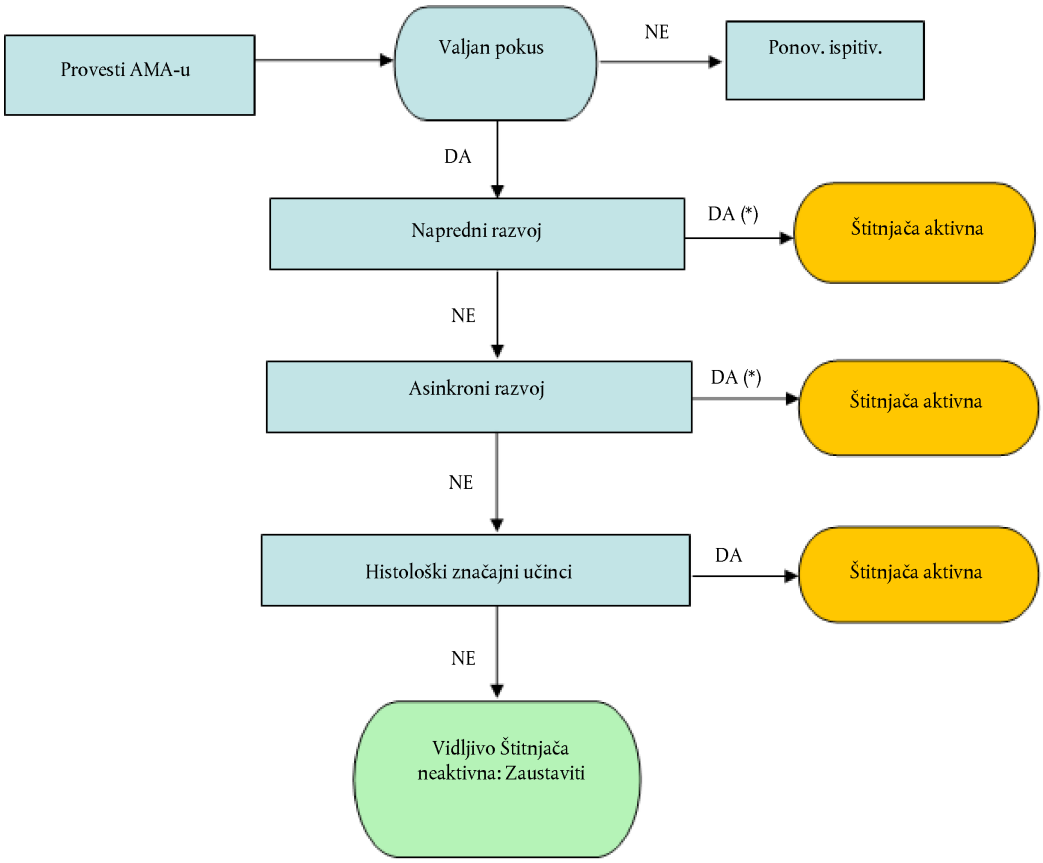
Logika odlučivanja za obavljanje AMA-e

46. Logika odlučivanja razvijena je za AMA-u kako bi osigurala logičku pomoć u vođenju i tumačenju rezultata bioanalize (vidi dijagram toka na slici 3.). U suštini, logika odlučivanja važe krajnje učinke u tom naprednom razvoju, asinkroni razvoj i histopatologija štitnjače važu se teško, dok se zakašnjeli razvoj, duljina od vrha njuške do kloake i mokra masa, tj. parametri na koje potencijalno može utjecati opća toksičnost, važu lakše.

▼M6

Slika 3.

Logika odlučivanja za obavljanje AMA-e



(*) Neka regulatorna tijela mogu zahtijevati histologiju unatoč znatnim razlikama u naprednom i asinkronom razvoju. Preporučuje se da osoba koja obavlja ovo ispitivanje konzultira potrebna tijela prije provođenja ispitivanja kako bi se utvrdili potrebni krajnji učinci.

Napredan razvoj (određen s pomoću stadija razvoja, SVL i HLL)

47. Poznato je da se napredan razvoj javlja samo kroz učinke koji su povezani s hormonom štitnjače. To mogu biti učinci na periferno tkivo kao što je izravna interakcija s receptorima hormona štitnjače (kao što je s T4) ili učinci koji mijenjaju razine cirkulirajućeg hormona štitnjače. U svakom slučaju, to se smatra dostatnim dokazom koji upućuje da kemikalija ima tiroidnu aktivnost. Napredan razvoj procjenjuje se na jedan od dvaju načina. Prvo, opći stadij razvoja može se procijeniti s pomoću standardiziranog pristupa Nieuwkoop i Fabera (8). Drugo, specifične morfološke karakteristike mogu se kvantitativno odrediti kao što je duljina stražnjih udova i 7. i 21. dana, što je pozitivno povezano s agonističkim učinkom na receptore hormona štitnjače. Ako dođe do statistički znatnog napredovanja u razvoju ili duljini stražnjih udova, tada ispitivanje pokazuje da kemikalija aktivno djeluje na štitnjaču.

▼M6

48. Procjena pokusnih životinja na prisutnost ubrzanog razvoja u odnosu na kontrolnu populaciju temeljit će se na rezultatima statističke analize provedene na sljedeća četiri krajnja učinka:

— duljina stražnjih udova (utvrđena SVL-om) 7. dana studije

— duljina stražnjih udova (utvrđena SVL-om) 21. dana studije

— stadij razvoja 7. dana studije

— stadij razvoja 21. dana studije

49. Statističke analize duljine stražnjih udova potrebno je obaviti na temelju mjerenja duljine lijevog stražnjeg uda. Duljina stražnjih udova utvrđuje se uzimanjem omjera duljine stražnjih udova i duljine od vrha njuške do kloake pojedine životinje. Zatim se prosjek utvrđene vrijednosti uspoređuje za svaku razinu obrade. Ubrzanje razvoja zatim karakterizira znatan porast prosječne duljine stražnjih udova (utvrđene) u skupini obrađenoj kemikalijom u usporedbi s kontrolnom skupinom 7. dana studije i/ili 21. dana studije (vidi Dodatak 3.).

50. Statističke analize stadija razvoja potrebno je obaviti na temelju određivanja stadija razvoja prema morfološkim kriterijima Nieuwkoop i Fabera (8). Ubrzanje razvoja karakterizira kada višekvantalna analiza otkrije znatan porast vrijednosti stadija razvoja u skupini obrađenoj kemikalijom u usporedbi s kontrolnom skupinom 7. dana studije i/ili 21. dana studije.

51. U ispitnoj metodi AMA-e znatan učinak na bilo koje od prethodno navedena četiri krajnja učinka smatra se dovoljnim za pozitivno otkrivanje ubrzanog razvoja. To jest, znatni učinci na duljinu stražnjih udova u određenoj vremenskoj točki ne zahtijevaju ni potvrdu znatnih učinaka na duljinu stražnjih udova u nekoj drugoj vremenskoj točki ni znatnih učinaka na stadij razvoja u toj određenoj vremenskoj točki. Po redoslijedu, znatni učinci na stadij razvoja u određenoj vremenskoj točki ne zahtijevaju ni potvrdu znatnih učinaka na stadij razvoja u nekoj drugoj vremenskoj točki ni znatnih učinaka na duljinu stražnjih udova u toj određenoj vremenskoj točki. Težina dokaza za ubrzani razvoj ipak se neće povećati ako se otkriju znatni učinci za više od jednog krajnjeg učinka.

Asinkroni razvoj (utvrđen s pomoću kriterija stadija razvoja)

52. Asinkroni razvoj karakterizira poremećaj relativnog izbora trenutka morfogeneze ili razvoja različitih tkiva unutar pojedinog punoglavca. Nemogućnost jasnog utvrđivanja stadija razvoja organizma s pomoću niza morfoloških krajnjih učinaka koji se smatraju tipičnim za svaki navedeni stadij pokazuje da se tkiva razvijaju asinkrono kroz metamorfozu. Asinkroni razvoj je pokazatelj tiroidne aktivnosti. Jedini poznati načini djelovanja koji prouzročuju asinkroni razvoj jesu kroz učinke kemikalija na djelovanje perifernog hormona štitnjače i/ili metabolizma hormona štitnjače u razvoju tkiva, kao što je primijećeno kod inhibitora bez joda.

▼**M6**

53. Procjena pokusnih životinja na prisutnost asinkronog razvoja u odnosu na kontrolnu populaciju temeljit će se na makromorfološkoj procjeni pokusnih životinja 7. i 21. dana studije.

54. Opis normalnog razvoja vrste *Xenopus laevis* Nieuwkoop i Fabera (8) pruža okvir za utvrđivanje sekvencijanog redoslijeda preoblikovanja normalnog tkiva. Pojam „asinkroni razvoj" odnosi se posebno na ona odstupanja u makromorfološkom razvoju punoglavca koja ne odbacuju konačno određivanje stadija razvoja u skladu s kriterijima Nieuwkoop i Fabera (8) jer ključne morfološke oznake pokazuju značajke različitih stadija.

55. Kao što implicira pojam „asinkroni razvoj", samo slučajevi koji pokazuju odstupanja u procesu preoblikovanja pojedinih tkiva u odnosu na napredak preoblikovanja drugih tkiva potrebno je uzeti u obzir. Neki klasični fenotipovi uključuju kašnjenje ili odsustvo preobrazbe prednjeg uda unatoč normalnom ili naprednom razvoju stražnjih udova i repnog tkiva ili preuranjenu resorpciju škrga u odnosu na stadij morfogeneze stražnjih udova i resorpcije repa. Zabilježit će se da životinja pokazuje asinkroni razvoj ako se ne može svrstati u neki stadij jer ne ispunjava većinu kriterija razvojnih oznaka za određeni Niewkoop i Faberov stadij (8) ili ako postoji znatno kašnjenje ili ubrzanje jednog ili više ključnih obilježja (npr. rep je u potpunosti resorbiran, ali prednji udovi nisu se preobrazili). Ova procjena obavlja se kvalitetno i potrebno je ispitati cijeli niz znatnih obilježja koji su naveli Nieuwkoop i Faber (8). Međutim, nije potrebno bilježiti stanje razvoja različitih znatnih obilježja životinja koje se promatraju. Životinje u kojih je zabilježeno da pokazuju akinkroni razvoj nisu svrstane u Nieuwkoop i Faberov (8) stadij razvoja.

56. Dakle, središnji kriterij za određivanje slučajeva nenormalnog morfološkog razvoja kao „asinkronog razvoja" jest taj da je relativan izbor trenutka preoblikovanja tkiva i morfogeneze tkiva poremećen, dok morfologija zahvaćenih tkiva očito nije nenormalna. Jedan primjer za ilustraciju ovog tumačenja makromorfoloških anomalija jest da će zakašnjela morfogeneza stražnjih udova u odnosu na razvoj drugih tkiva ispuniti kriterij „asinkronog razvoja", dok slučajeve koji pokazuju nepostojanje stražnjih udova, neprirodne brojke (npr. ektrodaktilija, polidaktilija) ili druge očite malformacije udova ne bi trebalo smatrati „asinkronim razvojem".

57. U tom kontekstu, glavne morforloške oznake koje je potrebno procijeniti u njihovu koordiniranom metamorfološkom napretku trebale bi uključivati morfogenezu stražnjih udova, morfogenezu prednjih udova, preobrazbu prednjih udova, stadij resorpcije repa (osobito resorpcije repne peraje) i morfologiju glave (npr. veličina škrga i stupanj resorpcije škrga, morfologija donje čeljusti, izbočenje Meckelove hrskavice).

58. Ovisno o načinu kemijskog djelovanja, može doći do različitih makromorfoloških fenotipova. Neki klasični fenotipovi uključuju kašnjenje ili odsustvo preobrazbe prednjeg uda unatoč normalnom ili naprednom razvoju stražnjih udova i repnog tkiva, preuranjenu resporpciju škrga u odnosu na stražnje udove ili preoblikovanje repa.

▼M6

Histopatologija

59. Ako kemikalija ne prouzročuje očitu toksičnost i ne ubrzava razvoj ili prouzročuje asinkroni razvoj, tada se histopatologija štitnjače procjenjuje primjenom odgovarajuće smjernice (9). Zaostajanje u razvoju, u nedostatku toksičnosti, snažan je pokazatelj antitiroidne aktivnosti, ali analiza stadija razvoja manje je osjetljiva i manje dijagnostička od histopatološke analize štitnjače. Stoga je u ovom slučaju potrebno provesti histopatološke analize štitnjače. Učinci na histologiju štitnjače pokazani su u nedostatku razvojnih učinaka. Ako se pojave promjene histopatologije štitnjače, tada se smatra da kemikalija aktivno djeluje na štitnjaču. Ako nisu opažena kašnjenja u razvoju ili histološke lezije u štitnim žlijezdama, tada se smatra da kemikalija ne djeluje na štitnjaču. Razlog za ovu odluku jest taj da je štitnjača pod utjecajem TSH-a i svaka kemikalija koja mijenja cirkulirajući hormon štitnjače u mjeri dovoljnoj da promijeni izlučivanje TSH-a, rezultirat će histopatološkim promjenama štitnjače. Različiti načini i mehanizmi djelovanja mogu promijeniti cirkulirajući hormon štitnjače. Dakle, dok je razina hormona štitnjače pokazatelj učinka povezanog sa štitnjačom, to nije dovoljno da bi se utvrdilo koji je način ili mehanizam djelovanja povezan s reakcijom.

60. Budući da ovaj krajnji učinak nije pogodan za osnovne statističke pristupe, utvrđivanje učinka povezanog s izlaganjem kemikaliji obavlja se putem stručnog mišljenja patologa.

Zakašnjeli razvoj (određen s pomoću stadija razvoja, HLL, BW, SVL)

61. Zakašnjeli razvoj može se pojaviti kroz antitiroidne mehanizme i kroz neizravnu toksičnost. Blaga kašnjenja u razvoju s očitim znakovima toksičnosti vjerojatno ukazuju na nespecifičan toksički učinak. Procjena netiroidne toksičnosti bitan je element ispitivanja kako bi se smanjila vjerojatnost lažnih pozitivnih rezultata. Pretjerana smrtnost očit je pokazatelj pojave ostalih toksičnih mehanizama. Slično tome, blaga smanjenja rasta, kako je utvrđeno mokrom masom i/ili duljinom od vrha njuške do kloake, upućuju i na netiroidnu toksičnost. Očigledna povećanja rasta obično se promatraju s kemikalijama koje negativno utječu na normalan razvoj. Prema tome, prisutnost većih životinja nužno ne znači netirodinu toksičnost. Međutim, ne bi se smjelo nikada osloniti samo na rast kako bi se odredila tiroidna toksičnost. Umjesto toga potrebno je upotrebljavati rast zajedno stadijem razvoja i histopatologijom štitnjače kako bi se utvrdila tiroidna aktivnost. Potrebno je uzeti u obzir i druge krajnje učinke u određivanju očite toksičnosti, uključujući edeme, hemoragijske lezije, letargiju, smanjenu potrošnju hrane, nepravilan/izmijenjen način plivanja itd. Ako sve ispitne koncentracije pokazuju očite znakove toksičnosti, ispitivanu kemikaliju potrebno je ponovno procijeniti pri nižim ispitnim koncentracijama prije utvrđivanja mogućnosti aktivnog djelovanja kemikalije na štitnjaču.

62. Statistički značajna kašnjenja u razvoju, u nedostatku drugih znakova očite toksičnosti, pokazuju da kemikalija aktivno djeluje na štitnjaču (antagonistički). U nedostatku čvrstih statističkih odgovora ovaj rezultat može se proširiti s rezultatima histopatologije štitnjače.

▼M6

Statističke analize

63. Statističke analize podataka trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (11). Za sve trajne kvantitativne krajnje učinke (HLL, SVL, mokra masa) u skladu s reakcijom na monotoničnu dozu potrebno je primijeniti Jonckheere-Terpstrin test postupnim snižavanjem kako bi se uspostavio značajan učinak obrade.

64. Za trajne krajnje učinke koji nisu u skladu s reakcijom na monotoničnu dozu podatke je potrebno procijeniti ispitivanjem normalnosti (po mogućnosti primjenom Shapiro-Wilkova ili Anderson-Darlingova testa) i homogenosti varijanci (po mogućnosti primjenom Leveneova testa). Oba ispitivanja provode se na ostacima iz ANOVA-e. Umjesto tih formalnih ispitivanja normalnosti i homogenosti varijanci, može se upotrebljavati stručna procjena iako su formalni testovi poželjni. Kada se utvrdi nenormalnost ili heterogenost varijanci, potrebno je potražiti normaliziranu pretvorbu za stabiliziranje varijanci. Ako su podaci (možda nakon pretvorbe) normalno distribuirani s homogenom varijancom, značajan učinak obrade utvrđuje se Dunnettovim testom. Ako su podaci (možda nakon pretvorbe) normalno distribuirani s heterogenom varijancom, značajan učinak obrade utvrđuje se Tamhane-Dunettovom ili T3 testom ili Mann-Whitney-Wilcoxonovim U testom. Kada se ne može pronaći normalizirana pretvorba, značajan učinak obrade utvrđuje se Mann-Whitney-Wilcoxonovim U testom s Bonferroni-Holmovim prilagođenim p-vrijednostima. Dunnettov test primjenjuje se neovisno od bilo kojeg ANOVA F-testa, a Mann-Whitneyov test primjenjuje se neovisno od bilo kojeg ukupnog Kruskall-Wallisovog testa.

65. Ne očekuje se značajna smrtnost, ali potrebno ju je procijeniti Cochran-Armitageovim testom postupnog snižavanja tamo gdje su podaci u skladu s reakcijom na monotoničnu dozu, a u protivnom Fisherovim testom s Bonferroni-Holmovim prilagođenim p-vrijednostima.

66. Značajan učinak obrade za razvojnu fazu utvrđuje se primjenom Jonckheere-Terpstrinog testa postupnog snižavanja, koji se primjenjuje na ponovljene srednje vrijednosti. Druga i preferirana mogućnost jest upotreba višekvantalnog Jonckheereova testa od 20. do 80. centila za određivanje učinka jer se njime uzimaju u obzir promjene u profilu distribucije.

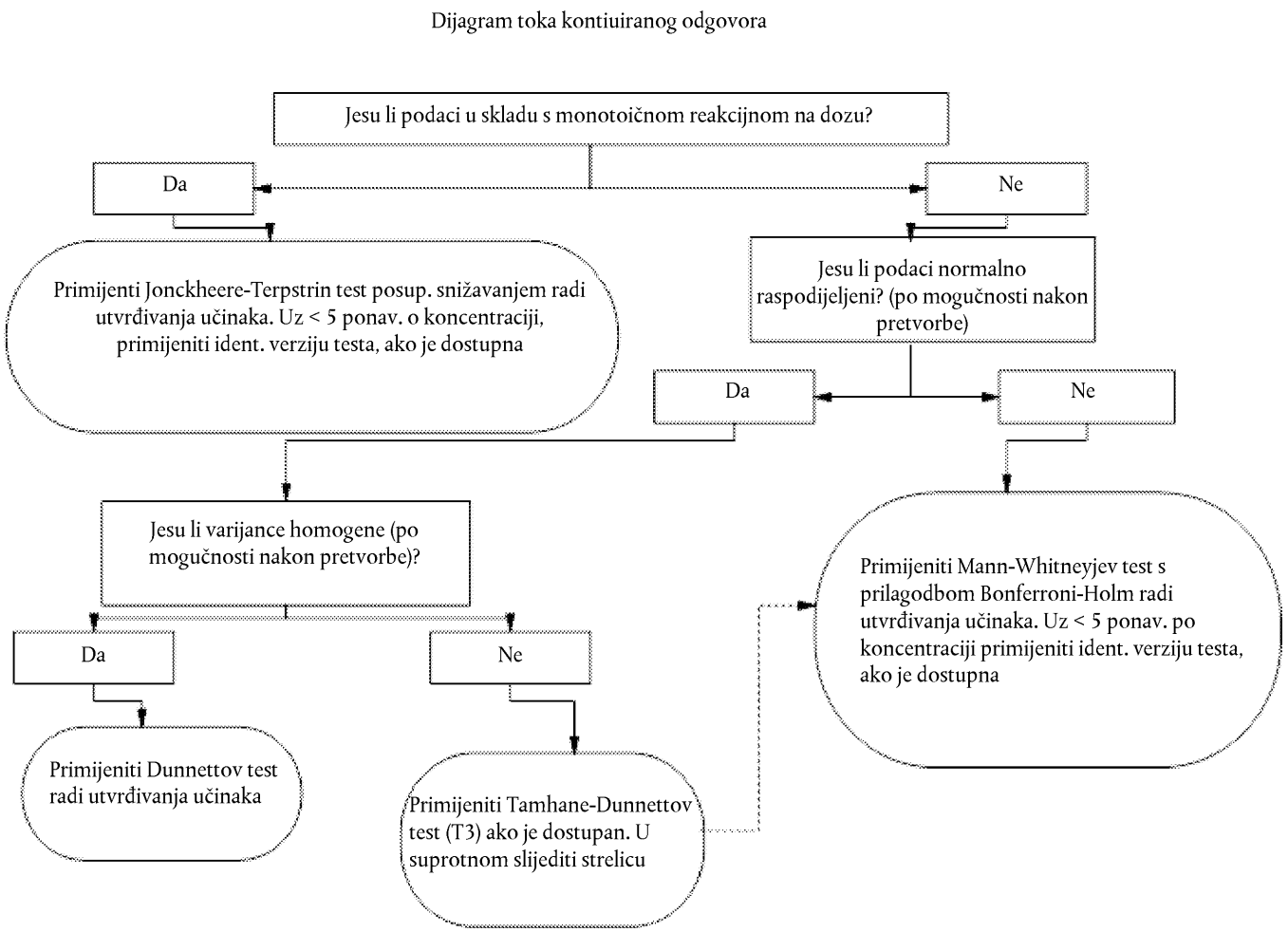
67. Odgovarajuća jedinica analize jest ponavljanje tako da se podaci sastoje od ponovljenih srednjih vrijednosti ako se upotrebljava Jonckheere-Terpstrin ili Mann-Whitneyev U test ili ponovljenih prosjeka ako se upotrebljava Dunnettov test. Reakcija na monotoničnu dozu može se vizualno procijeniti iz ponovljenih ili obrađenih prosjeka ili srednjih vrijednosti ili iz prethodno opisanih formalnih ispitivanja (11). S manje od pet ponavljanja po obradi ili kontroli potrebno je upotrebljavati točne verzije permutacije Jonckheere-Terpstrin i Mann-Whitneyeva testa ako su dostupni. Statistička značajnost svih navedenih ispitivanja ocjenjuje se na razini značajnosti 0,05.

68. Slika 4. jest dijagram toka za obavljanje statističkih ispitivanja na kontinuiranim podacima.

▼M6

Slika 4.

Dijagram toka za statističke pristupe za podatke o kontinuiranim reakcijama



02008R0440 — HR — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Razmatranja analize posebnih podataka

Upotreba kompromitirajućih razina obrade

69. Nekoliko čimbenika uzima se u obzir pri utvrđivanju pokazuje li ponavljanje ili cjelokupna obrada očitu toksičnost i je li potrebno ukloniti ih iz analize. Očita toksičnost definira se kao > 2 smrtnosti u svakom ponavljanju koje se samo može objasniti toksičnošću, a ne tehničkom pogreškom. Ostali znakovi očite toksičnosti uključuju krvarenje, neobična ponašanja, neuobičajene načine plivanja, anoreksiju i bilo koje druge kliničke znakove bolesti. Za subletalne znakove toksičnosti mogu biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno obaviti u odnosu na kontrolnu skupinu s čistom vodom.

Kontrolne skupine s otapalom

70. Uporabu otapala potrebno je uzeti u obzir samo kao krajnje sredstvo, kada se razmotre sve druge opcije prijenosa kemikalije. Ako se upotrebljava otapalo, tada je kontrolu s čistom vodom potrebno obaviti zajedno. Na kraju ispitivanja potrebno je obaviti procjenu mogućih utjecaja otapala. To se radi kroz statističku usporedbu kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s čistom vodom. Najvažniji krajnji učinci za razmatranje u ovoj analizi jesu stadij razvoja, SVL i mokra masa, s obzirom na to da se na njih može utjecati kroz netiroidnu toksičnost. Ako se otkriju statistički značajne razlike u tim krajnjim učincima između kontrolnih skupina s čistom vodom i kontrolnih skupina s otapalom, odredite krajnje učinke studije za mjere reakcije primjenom kontrole s čistom vodom. Ako nema statistički značajnih razlika između kontrole s čistom vodom i kontrole s otapalom za sve izmjerene varijable reakcije, odredite krajnje učinke studije za mjere reakcije primjenom zajedničkih kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i kontrolnih skupina s otapalom.

Obrađene skupine koje su postigle 60. stadij razvoja i iznad

71. Nakon 60. stadija punoglavci pokazuju smanjenje veličine i težine zbog resorpcije tkiva te smanjenje apsolutnog sadržaja vode. Dakle, mjerenja mokre mase i SVL-a ne mogu se primjereno upotrebljavati u statističkim analizama razlika u brzinama rasta. Stoga, podatke o mokroj masi i duljini organizama > NF60 potrebno je kritički osuditi i te ih nije moguće upotrebljavati u analizama ponavljanja prosjeka ili ponavljanja srednje vrijednosti. Mogu se upotrebljavati dva različita pristupa za analizu tih parametara povezanih s rastom.

72. Jedan pristup jest razmotriti samo punoglavce sa stadijima razvoja nižima ili jednakima 60. stadiju za statističke analize mokre mase i/ili SVL-a. Vjeruje se da ovaj pristup pruža dovoljno čvrstih informacija o ozbiljnosti mogućih učinaka rasta sve dok je samo mali udio pokusnih životinja uklonjen iz analize (≤ 20 %). Ako povećan broj punoglavaca pokazuje razvoj iznad 60. stadija (≥ 20 %) u jednoj ili više nazivnih koncentracija, tada je potrebno provesti dvofaktorsku ANOVA-u s ugniježđenom strukturom varijance na sve punoglavce kako bi se procijenili učinci rasta zbog kemijskih obrada, uzimajući u obzir učinak kasnog stadija razvoja na rast. U Dodatku 3. daju se smjernice o dvofaktorskoj analizi varijance težine i duljine.

LITERATURA

(1) OECD (2004.) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. br. 77., Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007.) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. br. 76. Pariz

(3) OECD (2008.) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. br. 92. Pariz

(4) OECD (2000.) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. br. 23. Pariz

(5) ASTM (2002.) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002.), Philadelpia, PA

(6) ASTM (2004.) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999.) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, str. 539. – 551.

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber, J. (1994.) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007.) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. br. 82. Pariz

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976.) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, str. 467. – 599.

(11) OECD (2006.) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, br. 54. Pariz

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; str. 69. – 92.

▼M6

Dodatak 1.

Tablica 1.

Pokusni uvjeti za 21-dnevnu analizu metamorfoze vodozemaca

Pokusna životinja		Ličinka vrste *Xenopus laevis*	
Početni stadij ličinke		51. stadij Nieuwkoop i Fabera	
Vrijeme izlaganja		21 dan	
Kriteriji odabira ličinaka		Razvojni stadij i ukupna duljina (fakultativno)	
Ispitne koncentracije		Najmanje tri koncentracije u rasponu otprilike jedan red veličine	
Režim izlaganja		Protočno (poželjno) i/ili statički s obnavljanjem	
Sustav za ispitivanje brzine protoka		25 ml/min (potpuna zamjena količine otprilike svakih 2,7 sati)	
Primarni krajnji učinci / Određivanje dana		Smrtnost	Svakodnevno
		Razvojni stadij	D 7. i 21.
		Duljina stražnjih udova	D 7. i 21.
		Duljina od vrha njuške do kloake	D 7. i 21.
		Mokra masa tijela	D 7. i 21.
		Histologija štitnjače	D 21
Voda za razrjeđivanje / Laboratorijska kontrola		Voda iz slavine iz koje je uklonjen klor (filtrirana aktivnim ugljenom) ili jednakovrijedni laboratorijski izvor	
Gustoća ličinaka		20 ličinaka / ispitna posuda (5/l)	
Ispitna otopina / ispitna posuda		4 – 10 l (minimalno 10 – 15 cm vode) / ispitna posuda od stakla ili nehrđajućeg čelika (npr., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Ponavljanje		četiri ponavljanja ispitne posude / ispitna koncentracija i kontrola	
Prihvatljive stope smrtnosti u kontrolama		≤ 10 % po ponavljanju ispitne posude	
Fiksacija štitnjače	Utvrđen broj	Svi punoglavci (pet / ponavljanja se početno procjenjuju)	
	Regija	Glava ili cijelo tijelo	
	Tekućina za fiksiranje	Davidsonov fiksativ	
Hranjenje	Hrana	Sera Micron® ili jednakovrijedni	
	Količina / učestalost	Vidi tablicu 1. za režim hranjenja uz Sera Micron®	
Osvjetljenje	Razdoblje svjetla i tame	12 sati svjetla: 12 sati tame:	

▼**M6**

	Intenzitet	od 600 do 2 000 luksa (izmjeren na površini vode)
Temperatura vode		22° ± 1 °C
pH-vrijednost		6,5 – 8,5
Koncentracija otopljenog kisika (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % zasićenosti kisikom)
Raspored uzorkovanja analitičke kemije		Jednom / tjedno (četiri uzorka događaja / ispitivanje)

▼M6

Dodatak 2.

Izvještajne tablice za sirove podatke i sažetak podataka

Tablica 1.

Opće informacije o ispitivanoj kemikaliji

Informacije o kemikaliji			
	Unijeti ispitivanu kemikaliju, jedinice koncentracije i obrade		
	Ispitivana kemikalija:		
	Jedinice koncentracije:		
	Obrada 1.		
	Obrada 2.		
	Obrada 3.		
	Obrada 4.		
	Datum (0. dan):		Unijeti datum (dd/mm/gg)
	Datum (7. dan):		Unijeti datum (dd/mm/gg)
	Datum (21. dan):		Unijeti datum (dd/mm/gg)

Tablica 2.

Tablice za prikupljanje sirovih podataka za 7. i 21. dan

DAN X
DATUM 00/00/00

	Koncentracija	Broj obrade	Broj ponavljanja	Pojedinačni broj	Pojedinačni identifikator	Stadij razvoja	Duljina od vrha njuške do kloake (mm)	Duljina stražnjih udova (mm)	Mokra masa cijelog organizma (mg)
REDAK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJ	BL	HLL	MASA
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Broj obrade	Broj ponavljanja	Pojedinačni broj	Pojedinačni identifikator	Stadij razvoja	Duljina od vrha njuške do kloake (mm)	Duljina stražnjih udova (mm)	Mokra masa cijelog organizma (mg)
REDAK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJ	BL	HLL	MASA
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Broj obrade	Broj ponavljanja	Pojedinačni broj	Pojedinačni identifikator	Stadij razvoja	Duljina od vrha njuške do kloake (mm)	Duljina stražnjih udova (mm)	Mokra masa cijelog organizma (mg)
REDAK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJ	BL	HLL	MASA
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Broj obrade	Broj ponavljanja	Pojedinačni broj	Pojedinačni identifikator	Stadij razvoja	Duljina od vrha njuške do kloake (mm)	Duljina stražnjih udova (mm)	Mokra masa cijelog organizma (mg)
REDAK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJ	BL	HLL	MASA
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼M6

Tablica 3.

Izračunani sažetci za podatke o krajnjim učincima od 7. do 21. dana

		Stadij razvoja			SVL (mm)		Duljina stražnjih udova (mm)		Masa (mg)	
TRT	REP	MINI-MALNO	SREDNJE	MAKSI-MALN-O	PROSJEK	STAN-DARDNO ODSTU-PANJE	PROSJEK	STAN-DARDNO ODSTU-PANJE	PROSJEK	STAN-DARDNO ODSTU-PANJE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Napomena: Izračuni polja povezani su s unosima podataka u tablicu 2.

Tablica 4.

Podaci o dnevnoj smrtnosti

Dan ispiti-vanja	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Dan ispiti-vanja	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Broj ponavljanja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Broj obrada		0				0				0				0			

Napomena: Izračuni polja povezani su s unosima podataka u tablicu 1.

Tablica 5.

Kriteriji kakvoće vode

Sustav izlaganja (protočan / statički s obnavljanjem):
Temperatura:
Jačina svjetlosti:
Ciklus svjetla i mraka:
Hrana:
Stopa hranjenja:
pH-vrijednost vode:
Koncentracija joda u ispitnoj vodi:

▼**M6**

Tablica 6.

Sažetak kemijskih podataka

Naziv kemikalije:																					
Cas #:																					
Dan ispitivanja	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Napomena: Izračuni polja povezani su s unosima podataka u tablicu 1.

▼**M6**

Tablica 7.

Izvještajne tablice za ključne histopatološke kriterije

Datum: Kemikalija:

Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1.	Kontrolna životinja ID – ponavljanje 2.	Hipertrofija štitnjače	Atrofija štitnjače	Hipertrofija folikularnih stanica	Hiperplazija folikularnih stanica
Ukupno:					

Patolog:

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.	Doza za životinju ID – ponavljanje 2.	Hipertrofija štitnjače	Atrofija štitnjače	Hipertrofija folikularnih stanica	Hiperplazija folikularnih stanica
Ukupno:					

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.	Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.	Hipertrofija štitnjače	Atrofija štitnjače	Hipertrofija folikularnih stanica	Hiperplazija folikularnih stanica
Ukupno:					

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.	Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.	Hipertrofija štitnjače	Atrofija štitnjače	Hipertrofija folikularnih stanica	Hiperplazija folikularnih stanica
Ukupno:					

▼**M6**

Tablica 8.

Dodatni histopatološki kriteriji

Datum: Kemikalija: Patolog:

Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1.		Povećanje područja lumena folikula	Smanjenje područja lumena folikula
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2.			
Ukupno:			

Doza za životinju ID – ponavljanje 1.		Povećanje područja lumena folikula	Smanjenje područja lumena folikula
Doza za životinju ID – ponavljanje 2.			
Ukupno:			

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.		Povećanje područja lumena folikula	Smanjenje područja lumena folikula
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.			
Ukupno:			

Doza za životinju ID – ponavljanje 1.		Povećanje područja lumena folikula	Smanjenje područja lumena folikula
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.			
Ukupno:			

▼**M6**

Tablica 9.

Narativni opisi histopatoloških nalaza

Datum:

Kemikalija:

Patolog:

		Narativni opis
Kontrolna životinja ID – ponavljanje 1.		
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2.		
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.		
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.		

▼**M6**

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.		
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.		

Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1.		
Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2.		

▼M6

Tablica 10.

Obrazac sažetka izvještajnih tablica za dan x (7. ili 21.) AMA-e

		Kontrola				Doza 1.					Doza 2.					Doza 3.				
Krajnji učinak	Ponavljanje	Srednja vrijed-nost	SD	CV	N	Srednja vrijed-nost	SD	CV	N	p-vrijed-nost	Srednja vrijed-nost	SD	CV	N	p-vrijed-nost	Srednja vrijed-nost	SD	CV	N	p-vrijed-nost
Stražnji udovi Duljina (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Srednja vrijednost:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Srednja vrijednost:																			
Mokra masa (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Srednja vrijednost:																			

▼M6

Tablica 11.

Obrazac sažetka izvještajnih tablica za dan x (7. ili 21.) podataka o razvojnom stadiju za AMA-u

		Kontrola				Doza 1.					Doza 2.					Doza 3.				
	Ponavljanje	Prosjek	Mini-malno	Maksi-malno	N	Prosjek	Mini-malno	Maksi-malno	N	p-vrijed-nost	Prosjek	Mini-malno	Maksi-malno	N	p-vrijed-nost	Prosjek	Mini-malno	Maksi-malno	Prosjek	p-vrijed-nost
Razvojni stadij	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Srednja vrijednost:																			

▼M6

Dodatak 3.

Alternativna analiza težine i duljine u slučaju da kasni stadij razvoja prelazi 20 % punoglavaca u jednoj ili više koncentracija

Ako povećan broj punoglavaca pokazuje razvoj iznad 60. stadija (≥ 20 %) u jednoj ili više nazivnih koncentracija, tada je potrebno provesti dvofaktorsku ANOVA-u s ugniježđenom strukturom varijance za sve punoglavce kako bi se procijenili učinci rasta zbog kemijskih obrada, uzimajući u obzir učinak kasnog stadija razvoja na rast.

Prijedlog je upotrebljavati sve podatke, ali uzeti u obzir učinak kasnog stadija razvoja. To se može učiniti dvofaktorskom ANOVA-om s ugniježđenom strukturom varijance. Definirati kasni stadij = „Da” za životinju ako je njezin stadij razvoja 61. ili veći. U protivnom definirati kasni stadij = „Ne”. Zatim se može provesti dvofaktorska ANOVA s koncentracijom i kasnim stadijem i njihovom interakcijom, s nasumičnim faktorom ponavljanja(koncentracija) i drugim nasumičnim faktorom punoglavci(ponavljanje). Time se još uvijek tretira ponavljanje kao jedinicu analize i dobivaju načelno isti rezultate kao ponderiranom analizom ponavljanja* prosjeka kasnog stadija, ponderiranom brojem životinja po prosjeku. Ako podaci ne ispunjavaju uvjete za ANOVA-u u smislu normalnosti distribucije ili homogenosti varijance, tada se može izvršiti normaliziracija transformiranjem apsolutnih podataka u raspored kako bi se otklonio taj prigovor.

Osim standardnih ANOVA F-testova za učinke koncentracije, kasnog stadija i njihove interakcije, interakcijski F-test može se podijeliti na dva dodatna ANOVA F-testa, jedan za srednje vrijednosti reakcija unutar koncentracija za kasniji stadij = „Ne” i drugi za srednje vrijednosti reakcija unutar koncentracija za kasni stadij = „Da.” Daljnje usporedbe srednjih vrijednosti obrada s kontrolom vrše se unutar svake razine kasnog stadija. Analiza vrste trenda može se obaviti primjernom odgovarajućih kontrasta ili jednostavnom usporedbom u paru ako postoji dokaz o reakciji na nemonotoničnu dozu unutar razine varijable kasne faze. Prilagođavanje p-vrijednostima Bonferroni-Holma vrši se samo ako odgovarajući F-test dijela nije značajan. To se može učiniti s pomoćuiSAS-a i, po mogućnosti, drugog softvera za statističku obradu. Komplikacije mogu nastati kada nema životinja kasnog stadija u nekim koncentracijama, ali te se situacije mogu riješiti na neposredan način.

▼**M6**

Dodatak 4.

Definicije

Kemikalija: Tvar ili smjesa

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M6

C.39. ISPITIVANJE REPRODUKCIJE SKOKUNA U TLU

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 232 (2009.). Ova ispitna metoda namijenjena je procjeni učinaka kemikalija na reproduktivnu uspješnost skokuna u tlu. Temelji se na postojećim postupcima (1) (2). Vrsta *Folsomia Candida*, koja se razmnožava bespolno i vrsta *Folsomia fimetaria*, koja se razmnožava spolno dvije su najpristupačnije vrste skokuna, mogu se kultivirati i komercijalno su dostupne. Kada treba procijeniti specifična staništa koja nisu nastanjena ovim dvjema vrstama, postupak se primjenjuje i na druge vrste skokuna ako mogu ispuniti validacijske kriterije ispitivanja.

2. Skokuni koji žive u tlu ekološki su relevantne vrste za ispitivanje ekotoksičnosti. Skokuni su šesteronošci s tankim vanjskim kosturom vrlo propusnim za zrak i vodu te predstavljaju vrstu člankonožaca s različitim smjerom i različitom stopom izlaganja u odnosu na gujavice i enhitreje.

3. Gustoća naseljenosti skokuna obično doseže 10^5 m^{-2} u tlu i slojevima otpalog lišća u mnogim kopnenim ekosustavima (3) (4). Odrasle jedinke obično su velike 0,5 – 5 mm, njihov je doprinos ukupnoj biomasi životinja u tlu i disanju nizak; procjenjuje se da iznosi između 1 % i 5 % (5). Stoga bi njihova najvažnija uloga mogla biti uloga potencijalnih regulatora procesa kroz grabežljivce koji se hrane mikroorganizmima i mikrofaunom. Skokuni su životinje koje služe kao plijen raznim beskralježnjacima koji žive u dubinskom i površinskom sloju tla, kao što su crvi, stonoge, pauci, trčci i kusokrilci. Skokuni pridonose procesima raspadanja u kiselim tlima gdje mogu biti najvažniji beskralježnjaci u tlu pored enhitreja, s obzirom na to da gujavice i stonoge obično nisu prisutne.

4. Vrsta *F. fimetaria* raširena je u cijelom svijetu i uobičajena u nekoliko vrsta tla, od pješčanog do ilovastog tla te od zrelih do sirovih humusa. To je skokun bez očiju i bez pigmenta. Nalazi se u poljoprivrednim zemljištima diljem Europe (6). Ima prehrambene navike svejeda i njegova hrana uključuje hife gljiva, bakterije, protozoe i organske otpatke. Uzajamno djeluje putem ispaše s infekcijama gljiva uzročnika bolesti biljaka (7) i može utjecati na mikorizu, kao što je to slučaj s vrstom F. candida. Kao većina vrsta skokuna, razmnožava se spolno uz stalnu prisutnost mužjaka za oplodnju jajašaca.

5. Vrsta *F. candida* jednako je tako raširena po cijelom svijetu. Iako nije uobičajena u većini prirodnih tla, često se pojavljuje u vrlo velikom broju na humusom bogatim mjestima. To je skokun bez očiju i bez pigmenta. Ima dobro razvijenu odskočnu vilicu (organ za skakanje), aktivno se kreće i lako skače ako je uznemiren. Ekološka uloga vrste *F. candida* slična je ulozi vrste *F. fimetaria*, ali njezina su staništa tla bogatija humusom. Razmnožava se bespolno. Mužjaci se mogu pojaviti u manje od jednog promila.

NAČELO ISPITIVANJA

6. Odrasli (*F. fimetaria*) ili mladi (*F. candida*) skokuni iste dobi izlažu se rasponu koncentracija ispitivane kemikalije pomiješane s promijenjenim umjetnim tlom (8) koristeći se sadržajem organske tvari od 5 % (ili alternativno tlo). Scenarij ispitivanja može se podijeliti u dvije faze:

— U slučaju da nema dovoljno informacija o toksičnosti, ispitivanje za određivanje raspona u kojem su smrtnost i reprodukcija osnovni

▼M6

konačni učinci koji se procjenjuju nakon dva tjedna za vrstu *F. fimetaria* i tri tjedna za vrstu *F. candida*.

— Konačno ispitivanje reprodukcije u kojem se procjenjuje ukupan broj potomaka nastalih od roditeljskih životinja i opstanak roditeljskih životinja. Trajanje ovog konačnog ispitivanja jest tri tjedna za vrstu *F. fimetaria* ili četiri tjedna za vrstu *F. candida*.

Toksični učinak ispitivane kemikalije na smrtnost odraslih jedinki i reproduktivnu uspješnost izražava se kao LC_x i EC_x slaganjem podataka na odgovarajući model nelinearnom regresijom kako bi se procijenila koncentracija koja bi prouzročila x % smrtnost ili smanjenje reproduktivne uspješnosti ili alternativno kao vrijednost NOEC-a/LOEC-a (9).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

7. Fizikalna svojstva, topljivost u vodi, log K_{ow}, podjelni koeficijent vode u tlu i tlak pare ispitivane kemikalije po mogućnosti bi trebali biti poznati. Poželjne su dodatne informacije o sudbini ispitivane kemikalije u tlu, kao što su stope fotolize i hidrolize te biotičke razgradnje. Kemijsku identifikaciju ispitivane kemikalije prema IUPAC nomenklaturi, CAS broj, seriju, partiju, strukturnu formulu i čistoću potrebno je dokumentirati ako su dostupni.

8. Ova ispitna metoda može se upotrebljavati za kemikalije topljive ili netopljive u vodi. Međutim, način primjene ispitivane kemikalije razlikovat će se sukladno tome. Ispitna metoda ne primjenjuje se na hlapljive kemikalije, tj. kemikalije za koje je konstanta Henryjeva zakona ili podjelni koeficijent zrak/voda veći od jedan ili na kemikalije u kojih je tlak pare veći od 0,0133 Pa na 25 °C.

VALJANOST ISPITIVANJA

9. Sljedeće kriterije potrebno je ispuniti u neobrađenim kontrolnim serijama kako bi se rezultat ispitivanja smatrao valjanim:

— Prosječna smrtnost odraslih životinja ne smije prelaziti 20 % na kraju ispitivanja;

— Prosječan broj mladih jedinki po posudi trebao bi biti najmanje 100 na kraju ispitivanja;

— Koeficijent varijacije izračunan za broj mladih jedinki trebao bi biti najmanje 30 % na kraju glavnog ispitivanja.

REFERENTNA KEMIKALIJA

10. Referentnu kemikaliju potrebno je testirati na njezinoj EC50 koncentraciji za odabranu vrstu tla bilo u redovitim intervalima ili je eventualno uključiti u svaki ispitni niz kako bi se provjerilo da je reakcija ispitnih organizama u ispitnom sustavu unutar normalne razine. Prikladna referentna kemikalija jest borna kiselina, kojom bi se reprodukcija trebala smanjiti za 50 % (10) (11) na oko 100 mg/kg suhe mase tla za obje vrste.

OPIS ISPITIVANJA

Ispitne posude i oprema

11. Spremnici koji mogu držati 30 g vlažnog tla jesu prikladne ispitne posude. Materijal bi trebao biti staklo ili inertna plastika (netoksično). Međutim, upotrebu plastičnih spremnika potrebno je izbjegavati ako je izlaganje ispitivanoj kemikaliji smanjeno zbog sorpcije. Ispitne posude trebale bi imati

▼M6

područje poprečnog presjeka koje omogućava da stvarna dubina tla u ispitnoj posudi bude 2 – 4 cm. Posude bi trebale imati poklopce (npr. staklo ili polietilen) koji su oblikovani kako bi se smanjilo isparavanje vode, čime se omogućava izmjena plinova između tla i atmosfere. Spremnik bi trebao biti barem djelomično proziran kako bi se omogućilo propuštanje svjetlosti.

12. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:

— ormar za sušenje;

— stereomikroskop;

— mjerač pH-vrijednosti i luksometar;

— vage prikladne točnosti;

— odgovarajuća oprema za regulaciju temperature;

— odgovarajuća oprema za kontrolu vlažnosti zraka (nije bitno ako su izložene posude pokrivene poklopcima);

— inkubator s kontroliranom temperaturom ili mala soba;

— pincete-hvataljke ili uređaj za protok zraka sa slabim usisom.

Priprema tla za ispitivanje

13. Upotrebljava se izmijenjeno umjetno tlo (8) sa sadržajem organske tvari od 5 %. Kao druga mogućnost može se upotrebljavati prirodno tlo s obzirom na to da umjetno tlo ne nalikuje prirodnim tlima. Preporučeni sastav umjetnog tla jest sljedeći (na temelju suhe mase, osušen na stalnu težinu na 105 °C):

— 5 % sphagnum treseta, sušenog na zraku i fino usitnjenog (prihvatljiva veličina čestica jest 2 ± 1 mm);

— 20 % kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %);

— oko 74 % industrijskog pijeska sušenog na zraku (ovisno o potrebnoj količini $CaCO_3$), pretežno sitni pijesak s više od 50 % čestica između 50 i 200 mikrona. Točna količina pijeska ovisi o količini $CaCO_3$ (vidi u nastavku), zajedno bi trebali iznositi 75 %.

— 1,0 % kalcijeva karbonata ($CaCO_3$, u prahu, analitički čist) kako bi se dobila pH-vrijednost od 6,0 ± 0,5; količina kalcijeva karbonata koja će se dodati može ovisiti ponajprije o kvaliteti/prirodi treseta (vidi napomenu 1.).

Napomena 1: Količina potrebnog $CaCO_3$ ovisit će o komponentama supstrata tla i potrebno ju je odrediti mjerenjem pH-vrijednosti predinkubiranih poduzoraka vlažnog tla neposredno prije ispitivanja.

Napomena 2: Preporučuje se mjerenje pH-vrijednosti i proizvoljno omjera C/N, kapaciteta izmjene kationa (CEC) i sadržaja organske tvari u tlu kako bi se omogućila normalizacija u kasnijoj fazi i bolje tumačili rezultati.

Napomena 3: Ako je potrebno, npr. za određene svrhe ispitivanja, prirodna tla s neonečišćenih mjesta mogu poslužiti kao ispitni supstrat i/ili supstrat za uzgoj kultura. Međutim, ako se upotrebljava prirodno tlo, potrebno mu je zabilježiti najmanje podrijetlo (mjesto skupljanja), pH-vrijednost, teksturu (distribucija veličine čestica), CEC i sadržaj organske tvari te ne smije biti kontaminirano. Za prirodno tlo preporučljivo je dokazati njegovu prikladnost za ispitivanje i za postizanje validacijskih kriterija ispitivanja prije upotrebe tla u glavnom ispitivanju.

▼M6

14. Suhi sastojci tla temeljito se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijskoj miješalici). Maksimalni vodni kapacitet (WHC) umjetnog tla određuje se u skladu s postupkom opisanim u Dodatku 5. Sadržaj vlage ispitivanog tla potrebno je optimizirati kako bi se postigla mekana porozna struktura tla zahvaljujući kojoj će skokuni moći ući u pore. To je obično između 40 i 60 % maksimalnog WHC-a.

15. Suho umjetno tlo prethodno se navlaži dodavanjem dovoljno deionizirane vode kako bi se dobila otprilike polovina konačnog sadržaja vode od dva do sedam dana prije početka ispitivanja kako bi se uravnotežila/stabilizirala kiselost. Za određivanje pH-vrijednosti upotrebljava se smjesa tla i otopina 1 M kalijeva klorida (KCl) i 0,01 M kalcijeva klorida ($CaCl_2$) u omjeru 1: 5 (prema Dodatku 6.). Ako je tlo kiselije od potrebnog raspona, može se regulirati dodavanjem odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ako je tlo lužnatije, može se regulirati dodavanjem anorganske kiseline koja je bezopasna za skokune.

16. Prethodno navlaženo tlo dijeli se u dijelove koji odgovaraju broju ispitnih koncentracija (i referentne kemikalije prema potrebi) i kontrolama koje se upotrebljavaju za ispitivanje. Dodaju se ispitivane kemikalije i regulira se sadržaj vode prema stavku 24.

Odabir i priprema pokusnih životinja

17. Vrsta *F. candida* koja se bespolno razmnožava jest preporučena vrsta s obzirom na to da je u prstenastom testu ispitne metode (11) ova vrsta ispunila validacijske kriterije za preživljavanje češće nego vrsta *F. fimetaria*. Ako se upotrebljava alternativna vrsta, trebala bi ispuniti validacijske kriterije navedene u stavku 9. Na početku ispitivanja životinje bi trebale biti dobro uhranjene i u dobi između 23 i 26 dana za vrstu *F. fimetaria* i između 9 i 12 dana za vrstu *F. candida*. Za svako ponavljanje, broj vrste *F. fimetaria* trebao bi biti deset mužjaka i deset ženki, a za vrstu *F. candida* potrebno je upotrebljavati deset ženki (vidi Dodatak 2. i Dodatak 3.). Istodobne životinje biraju se nasumice iz posudica te se njihovo zdravlje i fizičko stanje provjeravaju za svaku seriju koja se dodaje za ponavljanje. Svaka skupina od 10/20 jedinki dodaje se u nasumice odabrani ispitni spremnik i odabiru se velike ženke vrste *F. fimetaria* kako bi se osigurala jasna razlika od mužjaka vrste *F. fimetaria*.

Priprema ispitnih koncentracija

18. Mogu se upotrebljavati četiri načina primjene ispitivane kemikalije: 1) miješanje ispitivane kemikalije u tlo s vodom kao nosačem, 2) miješanje ispitivane kemikalije u tlo s organskim otapalom kao nosačem, 3) miješanje ispitivane kemikalije u tlo s pijeskom kao nosačem ili 4) primjena ispitivane kemikalije na površini tla. Izbor odgovarajuće metode ovisi o osobinama kemikalije i svrsi ispitivanja. Općenito, preporučuje se miješanje ispitivane kemikalije u tlo. Međutim, mogu se zahtijevati postupci primjene koji su u skladu s praktičnom upotrebom ispitivane kemikalije (npr. raspršivanje tekuće formulacije ili upotreba posebnih formulacija pesticida kao što su granule ili sredstva za tretiranje sjemenja). Tlo se tretira prije dodavanja skokuna, osim kada se ispitivana kemikalija dodaje na površini tla, skokunima je potrebno dopustiti da uđu u tlo.

Ispitivana kemikalija topljiva u vodi

19. Otopina ispitivane kemikalije priprema se u deioniziranoj vodi u količini dovoljnoj za sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Svaka otopina ispitivane kemikalije miješa se temeljito s jednom serijom prethodno navlaženog tla prije unosa u ispitnu posudu.

Ispitivana kemikalija netopljiva u vodi

20. Za kemikalije netopljive u vodi, ali topljive u organskim otapalima, ispitivana kemikalija može se otopiti u najmanjoj mogućoj količini prikladnog otapala (npr. acetonu), pri čemu se i dalje osigurava pravilno miješanje

▼M6

kemikalije u tlu i njezino miješanje s dijelom potrebnog kremenog pijeska. Potrebno je upotrebljavati samo hlapljiva otapala. Kada se upotrebljava organsko otapalo, sve ispitne koncentracije i dodatna negativna kontrola za otapalo trebali bi sadržavati istu minimalnu količinu otapala. Spremnike za primjenu potrebno je ostaviti otvorene tijekom određenog razdoblja kako bi se omogućilo da otapalo povezano s primjenom ispitivane kemikalije ispari, osiguravajući nerasipanje toksične kemikalije u tom razdoblju.

Ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi i organskim otapalima

21. Za kemikalije koje su slabo topljive u vodi i organskim otapalima, kremeni pijesak, koji bi trebao biti dio ukupnog pijeska dodanog u tlo, miješa se s količinom ispitivane kemikalije kako bi se dobila željena ispitna koncentracija. Ta se smjesa kremenog pijeska i ispitivane kemikalije dodaje prethodno navlaženom tlu i temeljito se izmiješa nakon dodavanja odgovarajuće količine deionizirane vode kako bi se dobio potrebni sadržaj vlage. Konačna se smjesa podijeli u ispitne posude. Taj se postupak ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a priprema se i prikladna kontrola.

Primjena ispitivane kemikalije na površini tla

22. Kada je ispitivana kemikalija pesticid, primjereno ga je nanijeti na površinu tla prskanjem. Tlo se tretira nakon dodavanja skokuna. Ispitni spremnici prvo se napune navlaženim supstratom tla, dodaju se životinje, a zatim se ispitni spremnici izvažu. Kako bi se izbjeglo svako izravno izlaganje životinja ispitivanoj kemikaliji izravnim kontaktom, ispitivana kemikalija nanosi se najmanje pola sata nakon uvođenja skokuna. Ispitivanu kemikaliju potrebno je nanijeti na površinu tla što ravnomjernije s pomoću prikladnog laboratorijskog uređaja za raspršivanje kako bi se simuliralo prskanje u polju. Nanošenje je potrebno obaviti na temperaturi unutar ± 2 °C varijacije, a za vodene otopine, emulzije ili disperzije primjenjuje se količina vode u skladu s preporukama za procjenu rizika. Količinu je potrebno provjeriti s pomoću odgovarajuće tehnike kalibracije. Posebne formulacije poput granula ili sredstva za tretiranje sjemenja mogli bi se primijeniti na način koji je u skladu s upotrebom u poljoprivredi. Hrana se dodaje nakon prskanja.

POSTUPAK

Uvjeti ispitivanja

23. Srednja temperatura ispitivanja trebala bi biti 20 ± 1 °C s temperaturnim područjem od 20 ± 2 °C. Ispitivanje se provodi u kontroliranim ciklusima svjetla i mraka (po mogućnosti 12 sati svjetla i 12 sati mraka) uz osvjetljenje od 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda.

24. Kako bi provjerili vlažnost tla, posude se važu na početku, u sredini i na kraju ispitivanja. Gubitak težine > 2 % dopunjuje se dodavanjem deionizirane vode. Potrebno je naglasiti da se gubitak vode može smanjiti održavanjem visoke vlažnosti zraka (> 80 %) u ispitnom inkubatoru.

25. pH-vrijednost potrebno je izmjeriti na početku i na kraju ispitivanja za određivanje raspona i za glavno ispitivanje. Mjerenja je potrebno provesti na jednom dodatnom kontrolnom uzorku i jednom dodatnom uzorku tretiranih (sve koncentracije) uzoraka tla koji su pripremljeni i održavani na isti način kao i ispitivane kulture, ali bez dodavanja skokuna.

Ispitni postupak i mjerenja

26. Za svaku ispitnu koncentraciju količina tla za ispitivanje koja odgovara 30 g svježe mase stavlja se u ispitnu posudu. Pripremaju se i kontrole vode, bez

▼M6

ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljava nosač za primjenu ispitivane kemikalije, uz ispitni niz potreban je jedan kontrolni niz koji sadržava samo nosač. Koncentracija otapala ili dispergenta trebala bi biti ista kao u posudama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju.

27. Pojedinačni skokuni pažljivo se prenose u svaku ispitnu posudu (rasporede se nasumice u ispitne posude) i stavljaju na površinu tla. Za učinkovit prijenos životinja može se upotrebljavati uređaj za protok zraka sa slabim usisom. Broj ponavljanja za ispitne koncentracije i za kontrole ovisi o planu ispitivanja koji se upotrebljava. Ispitne posude postavljaju se nasumično u ispitni inkubator i takvi položaji ponovno se nasumično raspoređuju jednom tjedno.

28. Za ispitivanje vrste *F. fimetaria* treba upotrebljavati 20 odraslih jedinki, deset mužjaka i deset ženki starih 23 – 26 dana po ispitnoj posudi. Dvadeset i prvog dana skokuni se ekstrahiraju iz tla i broje. Za vrstu *F. fimetaria* spol se razlikuje po veličini u seriji životinja iste dobi koja se upotrebljava za ispitivanje. Ženke su izrazito veće od mužjaka (vidi Dodatak 3.).

29. Za ispitivanje vrste *F. Candida* potrebno je upotrebljavati deset mladih jedinki starosti 9 – 12 dana po ispitnoj posudi. Dvadeset i osmog dana skokuni se ekstrahiraju iz tla i broje.

30. Kao prikladan izvor hrane dodaje se dovoljna količina suhog pekarskog kvasca u prahu, koji je dostupan u slobodnoj trgovini, npr. 2 – 10 mg u svakoj posudi na početku ispitivanja te nakon otprilike dva tjedna.

31. Na kraju ispitivanja procjenjuju se smrtnost i reprodukcija. Nakon tri tjedna (*F. fimetaria*) ili četiri tjedna (*F. candida*) skokuni se ekstrahiraju iz tla za ispitivanje (vidi Dodatak 4.) i broje (12). Skokun se bilježi kao mrtav ako nije prisutan u ekstrakciji. Metode ekstrakcije i brojenja potrebno je validirati. Valjanost uključuje učinkovitost ekstrakcije mladih životinja veću od 95 %, npr. dodavanjem poznatog broja tlu.

32. Praktičan sažetak i raspored ispitnog postupka navedeni su u Dodatku 2.

Plan ispitivanja

Ispitivanje za određivanje raspona

33. Prema potrebi provodi se ispitivanje za određivanje raspona s npr. pet koncentracija ispitivane kemikalije od 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suhe mase tla i dva ponavljanja za svaku obradu i kontrolu. Dodatne informacije, iz ispitivanja sa sličnim kemikalijama ili iz literature, o smrtnosti ili reprodukciji skokuna mogu biti korisne u odlučivanju o rasponu koncentracija koje se upotrebljavaju u ispitivanju za određivanje raspona.

34. Trajanje ispitivanja za određivanje raspona jest dva tjedna za vrstu *F. fimetaria* i tri tjedna za vrstu *F. candida* kako bi se osigurala proizvodnja legla mladih životinja. Na kraju ispitivanja procjenjuju se smrtnost i reprodukcija skokuna. Potrebno je zabilježiti broj odraslih i pojavu mladih životinja.

Glavno ispitivanje

35. Za određivanje EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) potrebno je ispitati dvanaest koncentracija. Preporučuju se najmanje dva ponavljanja za svaku obradu ispitne koncentracije i šest kontrolnih ponavljanja. Faktor razmaka može varirati ovisno o uzorku doze i reakcije.

▼M6

36. Za određivanje NOEC-a/LOEC-a potrebno je ispitati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku obradu koncentracije plus osam kontrola. Koncentracije je potrebno prorijediti faktorom koji ne prelazi 1,8.

37. Kombinirani pristup omogućuje utvrđivanje i NOEC-a/LOEC-a i EC_x-a. Za ovaj kombinirani pristup potrebno je upotrebljavati osam obrada koncentracije u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku obradu plus osam kontrola. Koncentracije je potrebno prorijediti faktorom koji ne prelazi 1,8.

38. Ako nema vidljivih učinaka pri najvišoj koncentraciji u ispitivanju za određivanje raspona (tj. 1 000 mg/kg), ispitivanje reprodukcije može se provesti kao granično ispitivanje s pomoću ispitne koncentracije od 1 000 mg/kg i kontrole. Granično ispitivanje pružit će mogućnost dokaza da ne postoji statistički značajan učinak pri graničnoj koncentraciji. Potrebno je upotrebljavati osam ponavljanja i za obrađeno tlo i za kontrolu.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

39. Reproduktivna uspješnost jest osnovni krajnji učinak (npr. broj mladih životinja proizvedenih po ispitnoj posudi). Statistička analiza, npr. postupak ANOVA-e, uspoređuje obrade Studentovim t-testom, Dunnettovim testom ili Williamsovim testom. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunavaju se za pojedinačne srednje vrijednosti obrada.

40. Broj preživjelih odraslih životinja u neobrađenim kontrolnim serijama jest glavni validacijski kriterij i potrebno ga je dokumentirati. Kao u ispitivanju za određivanje raspona, sve ostale štetne znakove potrebno je prijaviti i u završnom izvješću.

LCx i EC_x

41. Vrijednosti EC_x, uključujući s njima povezane donje i gornje granice pouzdanosti od 95 % za parametar, izračunavaju se primjenom odgovarajućih statističkih metoda (npr. logistička ili Weibullova funkcija, modificirana (potkraćena) Spearman-Karberova metoda ili jednostavna interpolacija). EC_x se dobiva uvođenjem vrijednosti koja odgovara x % kontrolne srednje vrijednosti u nađenoj jednadžbi. Za izračun EC_{50} ili bilo koji drugi EC_x cjelokupan skup podataka potrebno je podvrgnuti regresijskoj analizi. LC_{50} obično se procjenjuje analizom vjerojatnosti ili sličnom analizom koja uzima u obzir binomno distribuirane podatke o smrtnosti.

NOEC/LOEC

42. Ako se statističkom analizom namjerava utvrditi NOEC/LOEC, potrebni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Potrebno je upotrebljavati odgovarajuće statističke metode u skladu s OECD-ovom Smjernicom o sadašnjim pristupima statističke analize podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (9). Općenito, štetni učinci ispitivane kemikalije u usporedbi s kontrolom istražuju se primjenom jednosmjernog testiranja hipoteze na $p \leq 0,05$.

43. Normalna raspodjela i homogenost varijance može se ispitati primjenom odgovarajućeg statističkog testa, npr. Shapiro-Wilkova testa i Leveneova testa ($p \leq 0,05$). Mogu se provesti jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i naknadni višestruki usporedni testovi. Višestruke usporedbe

▼M6

(npr. Dunnettov test) ili testovi trenda postupnog snižavanja (npr. Williamsov test) mogu se upotrebljavati kako bi se izračunalo postoje li značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrola i raznih koncentracija ispitivane kemikalije (izbor preporučenog testa prema OECD-ovoj Smjernici (9)). U protivnome, za određivanje NOEC-a i LOEC-a mogle bi se upotrijebiti neparametrijske metode (npr. Bonferronijev-U-test prema Holmovom ili Jonckheere-Terpstra testu trenda).

Granično ispitivanje

44. Ako je granično ispitivanje (usporedba kontrole i samo jedne obrade) provedeno i uvjeti postupaka parametrijskih testova (normalnost, homogenost) ispunjeni, metrički odgovori mogu se ocijeniti Studentovim testom (t-test). Ako ti uvjeti nisu ispunjeni, mogu se upotrebljavati t-test nejednake varijance (Welchov t-test) ili neki neparametrijski test, kao što je Mann-Whitheyev-U test.

45. Za određivanje značajnih razlika između kontrolnih skupina (kontrolnih skupina i kontrolnih skupina s otapalom) ponavljanja svake kontrole mogu se testirati kao što je opisano za granično ispitivanje. Ako se ovim testovima ne otkriju značajne razlike, sva ponavljanja kontrolnih skupina i kontrolnih skupina s otapalom mogu se ujediniti. U protivnome, sve obrade potrebno je usporediti s kontrolnom skupinom s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

46. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati barem sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija

— identitet ispitivane kemikalije, serija, partija, CAS broj, čistoća;

— fizikalno-kemijska svojstva ispitivane kemikalije (npr. log Kow, topljivost u vodi, tlak pare, Henryjeva konstanta (H) i po mogućnosti informacije o sudbini ispitivane kemikalije u tlu, ako su raspoložive;

— potrebno je navesti formulaciju ispitivane kemikalije i aditive ako se ispituje kemikalija koja nije čista;

Ispitni organizmi

— identifikacija vrsta i dobavljača ispitnih organizama, opis uvjeta uzgoja i dobni raspon ispitnih organizama;

Uvjeti ispitivanja

— opis plana i postupaka pokusa;

— pojedinosti pripreme ispitnog tla; detaljna specifikacija ako se upotrebljava prirodno tlo (podrijetlo, povijest, distribucija veličine čestica, pH-vrijednost, sadržaj organske tvari);

— maksimalni vodni kapacitet tla;

— opis tehnike koja se upotrebljava za primjenu ispitivane kemikalije na tlo;

— uvjeti ispitivanja; jačina svjetlosti, trajanje ciklusa svjetla i mraka, temperatura;

— opis režima hranjenja, vrsta i količina hrane koja se upotrebljava u ispitivanju, datumi hranjenja;

— pH-vrijednost i sadržaj vode u tlu na početku i kraju ispitivanja (kontrola i svaka obrada);

— detaljan opis metode ekstrakcije i učinkovitosti ekstrakcije;

▼**M6**

Rezultati ispitivanja

— broj mladih životinja utvrđen u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;

— broj starih životinja i njihova smrtnost (%) u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;

— opis očitih fizioloških i patoloških simptoma ili izrazitih promjena u ponašanju;

— rezultati dobiveni s referentnom ispitivanom kemikalijom;

— vrijednosti NOEC-a/LOEC-a, LC_x za smrtnost i EC_x za reprodukciju (uglavnom LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} i EC_{10}) zajedno s 95 %-im intervalima pouzdanosti. grafikon prilagođenog modela koji se upotrebljava za izračun, njegova funkcionalna jednadžba i njegovi parametri (vidi (9));

— sve informacije i zapažanja korisna za tumačenje rezultata;

— snaga stvarnog ispitivanja ako se vrši ispitivanje hipoteze (9);

— odstupanja od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i bilo koje neobične pojave tijekom ispitivanja;

— valjanost ispitivanja;

— za NOEC, prilikom procjene, minimalna uočljiva razlika.

LITERATURA

(1) Wiles JA i Krogh PH (1998.) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke i CAM Van Gestel), str. 131. – 156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999.) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. br. 11267. Međunarodna organizacija za normizaciju, Ženeva

(3) Burges A i Raw F (Eds) (1967.) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H Luxton M (1982.) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287. – 388.

(5) Petersen H (1994.) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195.: 111. – 118.

(6) Hopkin SP (1997.). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. str. 330. (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983.) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30. kolovoza – 2. rujna 1982., I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, str. 261. – 268.

(8) Poglavlje C.36 ovog Priloga, *Ispitivanje reproduktivne toksičnosti u tlu za grabežljivu grinju (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer).*

(9) OECD (2006.), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006.)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ i Krogh PH (2005.) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project br. 986. Miljøstyrelsen str. 61. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project br. 1256, str. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998.) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201. – 205.

(13) Fjellberg A (1980.) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955.) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, str. 412. – 416.

(15) Goto HE (1960.) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96: 138.– 140.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije

Slijedeće definicije primjenjuju se na ovu ispitnu metodu (u ovom ispitivanju sve koncentracije s učinkom izražavaju se kao masa ispitivane kemikalije po suhoj masi ispitnog tla):

Kemikalija je tvar ili smjesa.

NOEC (najviša koncentracija bez vidljivog učinka) jest koncentracija ispitivane kemikalije u kojoj nije opažen učinak. U ovom ispitivanju koncentracija koja odgovara NEOC-u nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar navedenog razdoblja izlaganja u usporedbi s kontrolom.

LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom) jest najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja ima statistički značajan učinak ($p < 0,05$) unutar navedenog razdoblja izlaganja u usporedbi s kontrolom.

EC_x (koncentracija s učinkom za x % učinka) jest koncentracija koja uzrokuje x % učinka na ispitne organizme unutar navedenog razdoblja izlaganja u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC_{50} jest koncentracija za koju se procjenjuje da prouzročuje učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

Ispitivana kemikalija jest bilo koja tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

▼M6

Dodatak 2.

Glavne aktivnosti i raspored za obavljanje ispitivanja na skokunima

Faze ispitivanja mogu se sažeti kako slijedi:

Vrijeme (dan)	Aktivnost
od – 23 do – 26	Priprema kulture za jedinke iste dobi vrste *F. fimetaria*
– 14	Pripremiti umjetno tlo (miješanje suhih sastojaka) Provjeriti pH-vrijednost umjetnog tla i prilagoditi ga sukladno tome Izmjeriti maksimalni WHC tla
– 9 do – 12	Priprema kulture za jedinke iste dobi vrste *F. candida*
– 2 do – 7	Prethodno navlažiti tlo
–1	Rasporediti mlade životinje u serije Pripremiti radne otopine i primijeniti ispitivanu kemikaliju ako je potrebno otapalo
0	Pripremiti radne otopine i primijeniti ispitivanu kemikaliju ako je potrebna kruta kemikalija, topljiva u vodi ili površinska primjena Izmjeriti pH-vrijednost tla i izvagati spremnike. Dodati hranu. Uvesti skokune.
14	Ispitivanje za određivanje raspona vrste *F. fimetaria*: Prekinuti ispitivanje, izvaditi životinje, izmjeriti pH-vrijednost tla i gubitak vode (težina) Glavna ispitivanja: Izmjeriti sadržaj vlage i napuniti vodom te dodati 2 – 10 mg kvasca
21	Glavno ispitivanje vrste *F. fimetaria*: Prekinuti ispitivanje, izvaditi životinje, izmjeriti pH-vrijednost tla i gubitak vode (težina) Ispitivanje za određivanje raspona vrste*F. candida*: Prekinuti ispitivanje, izvaditi životinje, izmjeriti pH-vrijednost tla i gubitak vode (težina)
28	Glavno ispitivanje vrste *F. candida*: Prekinuti ispitivanje, izvaditi životinje, izmjeriti pH-vrijednost tla i gubitak vode (težina)

▼M6

Dodatak 3.

Smjernica o uzgoju i sinkronizaciji vrsta *F. fimetria* i *F. candida*

Vrijeme i trajanje navedeno u ovoj smjernici potrebno je provjeriti za svaki pojedini soj skokuna kako bi se osiguralo da će odabir trenutka omogućiti dovoljno mladih životinja iste dobi. Načelno, učestalost odlaganja jajašaca nakon što se odrasle životinje prenesu na svježi supstrat i jajašaca za nasad određuju odgovarajući dan za skupljanje jajašaca i skupljanje mladih životinja iste dobi.

Preporučuje se imati trajnu matičnu kulturu koji se sastoji od npr. 50 spremnika / Petrijevih zdjelica. Matičnu kulturu potrebno je držati u dobrim uvjetima hranjenja te ju tjedno hraniti, zalijevati vodom i uklanjati staru hranu i trupla. Premalo skokuna na supstratu može dovesti do inhibicije zbog većeg rasta gljivica. Ako se matična kultura upotrebljava prečesto za proizvodnju jajašaca, kultura se može umoriti. Znakovi umora jesu mrtve odrasle životinje i plijesan na supstratu. Preostala jajašca iz proizvodnje životinja iste dobi mogu se upotrebljavati za pomlađivanje kulture.

U sinkronoj kulturi vrste *F. fimetaria* mužjaci se razlikuju od ženki ponajprije po veličini. Mužjaci su očito manji od ženki, a brzina kretanja mužjaka veća je nego kod ženki. Pravilan odabir spola zahtijeva malo prakse i može se potvrditi mikroskopskim pregledom genitalnog područja (13).

1. **Uzgoj**

1.a. *Priprema supstrata za uzgoj kulture*

Supstrat za uzgoj kulture jest gips (kalcijev sulfat) s aktivnim ugljenom. Time se dobiva vlažan supstrat u kojem je funkcija ugljena apsorbirati otpadne plinove i izlučevine (14) (15). Različiti oblici ugljena mogu se upotrijebiti za olakšavanje promatranja skokuna. Na primjer, ugljen u prahu upotrebljava se za vrste *F. candida* i *F. fimetaria* (proizvodeći crno-sivi gips):

Sastojci supstrata:

— 20 ml aktivnog ugljena

— 200 ml destilirane vode

— 200 ml gipsa

ili

— 50 g aktivnog ugljena u prahu

— 260 – 300 ml destilirane vode.

— 400 g gipsa.

Prije upotrebe smjesu supstrata potrebno je pustiti da se staloži.

1.b. *Uzgoj*

Skokuni se drže u spremnicima kao što su Petrijeve zdjelice (90 mm × 13 mm) čije je dno pokriveno slojem supstrata gipsa/ugljena od 0,5 cm. Oni se uzgajaju na 20 ± 1 °C u ciklusu 12 sati svjetla i 12 sati mraka (400 – 800 luksa). Spremnici se stalno drže vlažnima i osiguravaju da relativna vlažnost zraka unutar spremnika bude 100 %. To se može zajamčiti prisustvom vode

▼M6

unutar poroznog gipsa, ali izbjegavanjem stvaranja filma vode na površini gipsa. Gubitak vode može se spriječiti dotokom vlažnog zraka iz okoline. Sve mrtve jedinke potrebno je ukloniti iz spremnika, kao i svu pljesnivu hranu. Za poticanje proizvodnje jajašaca potrebno je prenijeti odrasle životinje na Petrijeve zdjelice s novopripremljenim supstratom gipsa/ugljena.

1.c. *Izvor hrane*

Suhi pekarski kvasac u granulama upotrebljava se kao jedini izvor hrane i za vrste *F. candida* i *F. fimetaria*. Svježa hrana daje se jednom ili dva puta tjedno kako bi se izbjeglo pljesnivljenje. Stavlja se izravno na gips u maloj gomili. Masu dodanog pekarskog kvasca potrebno je prilagoditi veličini populacije skokuna, ali u pravilu dovoljno je 2 – 15 mg.

2. **Sinkronizacija**

Ispitivanje je potrebno provesti sa životinjama iste dobi kako bi se dobile homogene pokusne životinje istog stadija i veličine. Nadalje, sinkronizacijom se omogućuje razlikovanje mužjaka i ženki vrste *F. fimetaria* u dobi od tri tjedna i nadalje na temelju spolnog dimorfizma, tj. razlika u veličini. Postupak u nastavku jest prijedlog o tome kako dobiti životinje iste dobi (praktični koraci nisu obvezni).

2.a. *Sinkronizacija.*

— Pripremiti spremnike sa slojem supstrata gipsa/ ugljena od 0,5 cm.

— Za nesenje jajašaca prenijeti 150 – 200 odraslih životinja vrste *F. fimetaria* i 50 – 100 vrste *F. candida* iz najboljih 15 – 20 spremnika matične kulture sa supstratom starim od četiri do osam tjedana u spremnike i hraniti ih s 15 mg pekarskog kvasca. Izbjegavati dovođenje mladih životinja s odraslim životinjama s obzirom na to da prisutnost mladih životinja može usporiti proizvodnju jajašaca.

— Držati kulturu na 20 ± 1 °C (srednja vrijednost trebala bi biti 20 °C) i u ciklusu 12 sati svjetla i 12 sati mraka (400 – 800 luksa). Omogućiti da je svježa hrana dostupna i zrak zasićen vodom. Nedostatak hrane može dovesti do toga da životinje vrše nuždu po jajašcima, što dovodi do rasta gljivica na jajašcima ili vrsta *F. candida* može pojesti vlastita jajašca. Nakon deset dana jajašca se pažljivo skupljaju iglom i lopaticom te se premještaju na „papir za jajašca” (komadići filtarskog papira umočenog u suspenziju gipsa/ugljena) koji se stavlja u spremnik sa svježim supstratom gipsa/ugljena. Nekoliko zrna kvasca dodaje se supstratu kako bi privuklo mlade životinje i potaknulo ih da napuste papir za jajašca. Važno je da papir za jajašca i supstrat budu vlažni jer će u protivnome jajašca dehidrirati. Kao druga mogućnost odrasle životinje mogu se ukloniti iz kutije za sinkronizaciju kulture nakon proizvodnje jajašaca za dva ili tri dana.

— Nakon tri dana većina jajašaca na papiru za jajašca izleći će se, a poneke mlade životinje mogu se naći ispod papira za jajašca.

— Kako bi se dobile mlade životinje iste dobi, papir za jajašca s neizlegnutim jajašcima uklanja se pincetom iz Petrijeve zdjelice. Mlade životinje, sada stare od nula do tri dana, ostaju u posudi i hrane se pekarskim kvascem. Neizlegnuta jajašca bacaju se.

— Jaja i izlegnute mlade životinje uzgajaju se na isti način kao i odrasle životinje. Posebno za vrstu *F. fimetaria* potrebno je poduzeti sljedeće mjere: osigurati dovoljno svježe hrane, ukloniti staru pljesnivu hranu, nakon tjedan dana mlade životinje podijele se u nove Petrijeve zdjelice pod uvjetom da je gustoća iznad 200.

▼M6

2.b. *Rukovanje skokunima na početku ispitivanja*

— Vrsta *F. candida* stara od devet do 12 dana ili od 23 do 26 dana stara vrsta *F. fimetaria* prikupljaju se npr. usisavanjem i puštaju u mali spremnik s vlažnim supstratom gipsa/ugljena, a njihovo fizičko stanje provjerava se dvogledom (ozlijeđene i oštećene životinje uklanjaju se). Sve faze potrebno je izvršiti čuvajući skokune u vlažnoj atmosferi kako bi se izbjegao stres zbog suše, npr. primjenom navlaženih površina itd.

— Okrenuti spremnik naopako i kucati po njemu kako bi se skokuni premjestili na tlo. Statički elektricitet potrebno je neutralizirati, u protivnome životinje mogu samo poletjeti u zrak ili se priljubiti uz stranu ispitnog spremnika i isušiti. Ionizator ili vlažna krpa ispod spremnika može se upotrebljavati za neutralizaciju.

— Hranu je potrebno raširiti po cijeloj površini tla, a ne samo na jednoj hrpi.

— Tijekom prijevoza i tijekom razdoblja ispitivanja potrebno je izbjegavati kucanje ili drugi fizički poremećaj ispitnog spremnika s obzirom na to da se tako može povećati zbijanje tla i ugroziti interakcija između skokuna.

3. **Alternativne vrste skokuna**

Za ispitivanje u skladu s ovom ispitnom metodom mogu se izabrati druge vrste skokuna, kao što su Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. Prije primjene alternativnih vrsta potrebno je ispuniti brojne preduvjete:

— potrebno ih je nedvosmisleno identificirati;

— potrebno je dati obrazloženje za odabir vrste;

— potrebno je osigurati da se reproduktivna biologija uključi u fazu testiranja tako da će biti potencijalna meta tijekom izlaganja;

— potrebno je poznavati životnu povijest: dob pri sazrijevanju, trajanje razvoja jajašaca i stadija koji su predmet izlaganja;

— optimalne uvjete za rast i razmnožavanje potrebno je osigurati ispitnim supstratom i opskrbom hranom;

— varijabilnost bi trebala biti dovoljno niska za precizno i točno određivanje toksičnosti.

▼M6

Dodatak 4.

Uzimanje i brojenje životinja

1. **Mogu se provesti dvije metode ekstrakcije:**

1.a. Prva metoda: može se upotrebljavati uređaj za ekstrakciju s kontroliranim temperaturnim gradijentom koji se temelji na načelima MacFadyena (1). Toplina dolazi od grijaćeg elementa na vrhu kutije za ekstrakciju (regulira se s pomoću termistora postavljenog na površini uzorka tla). Temperatura u ohlađenoj tekućini koja okružuje sabirnu posudu regulira se s pomoću termistora koji se nalazi na površini kutije za ekstrakciju (smještene ispod jezgre tla). Termistori su povezani s programabilnom kontrolnom jedinicom koja podiže temperaturu prema unaprijed programiranom rasporedu. Životinje se prikupljaju u ohlađenu kutiju za prikupljanje (2 °C) s donjim slojem gipsa/ugljena. Ekstrakcija započinje na 25 °C i temperatura se automatski povećava svakih 12 sati za 5 °C te ima ukupno trajanje od 48 sati. Nakon 12 sati na 40 °C ekstrakcija je završena.

1.b. Druga metoda: Nakon eksperimentalnog razdoblja inkubacije broj prisutnih mladih skokuna procjenjuje se plutanjem. U tu svrhu ispitivanje se provodi u posudama volumena od otprilike 250 ml. Na kraju ispitivanja dodaje se otprilike 200 ml destilirane vode. Tlo se lagano miješa finim kistom kako bi se omogućilo skokunima da plutaju na površini vode. Mala količina, otprilike 0,5 ml crne Kentmereove boje za fotografiju može se dodati u vodu radi pomoći u brojenju povećanjem kontrasta između vode i bijelih skokuna. Boja nije toksična za skokune.

2. **Brojenje:**

Brojenje se može obaviti golim okom ili pod svjetlosnim mikroskopom upotrebom rešetke postavljene iznad posude za plutanje ili fotografiranjem površine svake posude i kasnije brojenjem skokuna na povećanim fotografijama ili projiciranim dijapozitivima. Brojenje se može obaviti i s pomoću tehnika za digitalnu obradu slike (12). Sve tehnike potrebno je provjeriti.

▼M6

Dodatak 5.

Određivanje maksimalnog WHC-a tla

Utvrđeno je da je prikladna sljedeća metoda za određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta (WHC) tla. Opisana je u Dodatku C ISO DIS 11268-2 (Kakvoća tla – Učinci onečišćujućih tvari na gujavice (*Eisenia fetida*). Dio 2.: Određivanje učinaka na reprodukciju).

Prikupiti određenu količinu (npr. 5 g) supstrata tla za ispitivanje s pomoću prikladnog uređaja za uzorkovanje (cijev s pužnim transporterom i sl.). Pokriti dno cijevi komadom vlažnog filtarskog papira i zatim ga staviti na stalak u vodenoj kupelji. Cijev je potrebno postupno uroniti dok razina vode ne bude iznad vrha tla. Zatim ju je potrebno ostaviti u vodi oko tri sata. Budući da se ne može zadržati sva voda koju apsorbiraju kapilare tla, uzorku tla potrebno je dati dva sata da se osuši postavljanjem cijevi na podlogu od vrlo vlažnog fino usitnjenog kremenog pijeska koji se nalazi u pokrivenoj posudi (kako bi se spriječilo isušivanje). Uzorak se zatim važe i suši do konstantne mase pri 105 °C. Vodni kapacitet (WHC) potrebno je izračunati na sljedeći način:

$$\mathrm{WHC(u\ \%\ suhe\ mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Gdje je:

S = supstrat zasićen vodom + masa cijevi + masa filtarskog papira

T = tara (masa cijevi + masa filtarskog papira)

D = suha masa supstrata

▼**M6**

Dodatak 6.

Određivanje pH-vrijednosti tla

Sljedeća metoda za određivanje pH-vrijednosti tla temelji se na opisu navedenim u ISO DIS 10390: Kakvoća tla – određivanje pH-vrijednosti.

Utvrđena količina zemlje suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Zatim se izrađuje suspenzija tla (koja sadržava najmanje 5 g tla) u peterostruko većem volumenu 1 M otopine analitički čistog kalijeva klorida (KCl) ili 0,01 M otopine analitički čistog kalcijeva klorida ($CaCl_2$). Suspenzija se zatim temeljito protresa pet minuta i zatim se ostavi da se sliježe najmanje dva sata, ali ne dulje od 24 sata. Potom se pH-vrijednost tekuće faze mjeri s pomoću mjerača pH-vrijednosti koji je kalibriran prije svakog mjerenja s pomoću odgovarajućeg niza puferskih otopina (npr. pH 4,0 i 7,0).

▼M6

C.40. **TOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE UNUTAR ŽIVOTNOG CIKLUSA TRZALACA (*CHIRONOMIDAE*) U VODI IZ SEDIMENTA S VODOM OBRAĐENOM SPIKINGOM ILI SA SEDIMENTOM OBRAĐENIM SPIKINGOM**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) br. 233 (2010.). Namijenjena je procjeni učinaka cjeloživotnog izlaganja kemikalijama slatkovodnih dvokrilaca trzalaca (*Chironomus* sp.) i u cijelosti obuhvaća prvu generaciju (roditeljsku generaciju) i rani dio druge generacije (filijalna generacija). Predstavlja proširenje postojećih ispitnih metoda C.28. (1) ili C. 27. (15) s pomoću scenarija izlaganja u vodi obrađenoj spikingom ili scenarija sedimenta obrađenog spikingom. Uzima u obzir postojeće protokole ispitivanja toksičnosti za *Chironomus riparius* i *Chironomus dilutus* (prethodnog naziva *C. tentans* (2)) koji su razvijeni u Europi i Sjevernoj Americi (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) i naknadno ispitani u prstenastom testu (1)(7)(11)(12). Mogu se upotrebljavati i druge vrste trzalaca o kojima postoji opsežna dokumentacija, npr. *Chironomus yoshimatsui* (13)(14). Ukupno trajanje izlaganja jest otprilike 44 dana za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a otprilike 100 dana za *C. dilutus*.

2. U ovoj su ispitnoj metodi opisani scenarij izlaganja u vodi i scenarij izlaganja u sedimentu. Odabir prikladnog scenarija izlaganja ovisi o namijenjenoj primjeni ispitivanja. Namjena scenarija izlaganja u vodi, obrađivanja vodenog stupca spikingom, jest simulirati rasap pesticida, a obuhvaća početnu vršnu koncentraciju u površinskim vodama. Obrađivanje vode spikingom korisno je i za druge vrste izlaganja (uključujući i izlijevanja kemikalija), no ne i za procese akumulacije unutar sedimenta koji traju dulje od razdoblja ispitivanja. U tom bi slučaju, kao i kad je otjecanje glavni način na koji pesticidi ulaze u vodu, prikladniji mogao biti plan koji uključuje sediment obrađen spikingom. Plan ispitivanja lako se može prilagoditi pokaže li se korisnima drugi scenariji izlaganja. Na primjer, ako raspodjela ispitivane kemikalije između vodene faze i sloja sedimenta nije od interesa i potrebno je smanjiti adsorpciju na sediment na najmanju moguću razinu, može se uzeti u obzir upotrebu surogatnog umjetnog sedimenta (npr. kremenog pijeska).

3. Kemikalije u odnosu na koje je potrebno ispitivanje organizama koji žive u sedimentu mogu dugo opstati u sedimentu. Organizmi koji žive u sedimentu mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno kako bi svaki od tih načina pridonio cjelokupnom toksičnom učinku ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima kemikalije. U slučaju jako adsorptivnih kemikalija ili kemikalija koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama gutanje kontaminirane hrane može biti važan način izlaganja. Kako se ne bi podcijenila toksičnost izrazito lipofilnih kemikalija, u obzir se može uzeti upotreba hrane koja se dodaje sedimentu prije primjene ispitivane kemikalije (vidi stavak 31.). Stoga je moguće uključiti sve načine izlaganja i sve životne stadije.

4. Izmjereni krajnji učinci ukupan su broj preobraženih odraslih životinja (za prvu i drugu generaciju), brzina razvoja (za prvu i drugu generaciju), omjer spolova živih odraslih životinja koje su se u cijelosti preobrazile (za prvu i drugu generaciju), broj skupina jajašaca po ženki (samo prva generacija) i stvarna plodnost jajašaca (samo prva generacija).

5. Svakako se preporučuje formulirani sediment. Formulirani sediment ima nekoliko prednosti nad prirodnim sedimentima:

▼M6

— pokusna varijabilnost smanjena je jer stvara mjerno obnovljivu „standardiziranu matricu” te se eliminira potreba za pronalaženjem nekontaminiranog i čistog sedimenta;

— ispitivanja se mogu provoditi u bilo koje doba, a da se pritom ne suočava sa sezonskom varijabilnošću u ispitnom sedimentu, a nema ni potrebe za prethodnom obradom sedimenta radi uklanjanja urođene faune;

— sniženi troškovi u usporedbi s terenskim prikupljanjem dovoljnih količina potrebnih za rutinsko ispitivanje;

— formulirani sediment omogućuje usporedbe toksičnosti po studijama i razvrstavanje kemikalija u skladu s tim (3).

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ličinke trzalaca u prvom stadiju razvoja izlažu se rasponu koncentracija ispitivane kemikalije u sustavu sediment/voda. Ispitivanje počinje stavljanjem ličinaka trzalaca u prvom stadiju razvoja (prva generacija) u ispitne laboratorijske čaše u kojima se nalazi sediment obrađen spikingom ili se ispitivana kemikalija dodaje spikingom u vodu nakon dodavanja ličinaka. Procjenjuju se preobrazba trzalaca, vrijeme preobrazbe i omjer spolova živih mušica koje su se u cijelosti preobrazile. Preobražene odrasle životinje prenose se u kaveze za uzgoj kako bi se mogle rojiti, pariti i polagati jajašca. Procjenjuju se broj proizvedenih skupina jajašaca i njihova stvarna plodnost. Iz tih se skupina jajašaca dobivaju ličinke u prvom stadiju razvoja druge generacije. Te se ličinke stavljaju u svježe pripremljene ispitne laboratorijske čaše (postupak spikinga kao u slučaju prve generacije) kako bi se utvrdila održivost druge generacije procjenom njihove preobrazbe, vremena preobrazbe i omjera spolova živih mušica koje su se u cijelosti preobrazile (shematski prikaz ispitivanja životnog ciklusa nalazi se u Dodatku 5.). Svi se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize u cilju određivanja koncentracije koja bi izazvala X %-tno smanjenje relevantnog krajnjeg učinka bilo testiranjem hipoteze u cilju određivanja najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC). Za potonje je potrebna usporedba reakcija na tretman s odgovarajućim kontrolnim odgovorima s pomoću statističkih testova. Potrebno je napomenuti da bi u scenariju vode obrađene spikingom, u slučaju kemikalija koje se brzo razgrađuju, kasniji životni stadiji svake generacije (npr. faza kukuljice) mogli biti izloženi znatno nižoj razini koncentracije u vodi iznad sedimenta u odnosu na ličinke u prvom stadiju razvoja. Ako to predstavlja problem i ako je potrebna usporediva razina izlaganja za svaki životni stadij, mogu se uzeti u obzir sljedeće izmjene ispitne metode:

— paralelna ispitivanja sa spikingom u različitim životnim stadijima ili

— ponovljeno obrađivanje (ili obnova vode iznad sedimenta) ispitnog sustava spikingom za vrijeme obiju faza ispitivanja (prva i druga generacija), pri čemu je intervale obrade spikingom (obnove) potrebno prilagoditi svojstvima sudbine ispitivane kemikalije.

Takve su izmjene izvedive samo u slučaju vode obrađene spikingom, ne i u slučaju sedimenta obrađenog spikingom.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

8. Trebali bi biti poznati topljivost ispitivane kemikalije u vodi, njezin tlak pare i log K_{ow}, izmjerena ili izračunana razdioba u sedimentu te stabilnost u vodi i sedimentu. Trebala bi biti dostupna pouzdana analitička metoda kvantifikacije ispitivane kemikalije u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i sedimentu, s poznatom i prijavljenom preciznošću i granicama detekcije.

▼M6

Korisne informacije uključuju strukturnu formulu i čistoću ispitivane kemikalije. Korisna je informacija i kemijska sudbina ispitivane kemikalije (npr. rasipanje, abiotička i biotička razgradnja itd.). Daljnje smjernice za ispitivanje kemikalija čija su fizikalno-kemijska svojstva takva da je zbog njih teško provoditi ispitivanja nalaze se u (16).

REFERENTNE KEMIKALIJE

9. Referentne kemikalije mogu se ispitivati periodično kao način kojim se osigurava nepromjenjivost osjetljivosti laboratorijske populacije. Kao u slučaju dafnija, bit će dovoljno provesti 48-satno ispitivanje akutne toksičnosti (u skladu sa 17). Međutim, dok ne bude dostupna potvrđena smjernica za akutnu toksičnost, u obzir se može uzeti ispitivanje kronične toksičnosti u skladu s poglavljem C.28. ovog Priloga. Primjeri referentnih toksičnih tvari koje se uspješno upotrebljavaju u prstenastim testovima i validacijskim studijama jesu: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid i kalijev klorid (1) (3) (6) (7) (18).

VALJANOST ISPITIVANJA

10. Kako bi ispitivanje bilo valjano, primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— prosječna uspješnost preobrazbe u kontrolnoj skupini trebala bi iznositi najmanje 70 % na kraju razdoblja izlaganja za obje generacije (1)(7);

— za *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, 85 % ukupnih ličinaka iz kontrolne skupine stavljenih u posude u prvom stadiju razvoja trebalo bi se preobraziti u odrasle mušice nakon 12 do 23 dana; za *C. dilutus* prihvatljivo je razdoblje od 20 do 65 dana;

— srednji omjer spolova živih odraslih životinja koje su se u cijelosti preobrazile (kao udio ženki ili mužjaka) u kontrolnoj skupini obiju generacija treba iznositi najmanje 0,4, a najviše 0,6;

— za svaki kavez za uzgoj broj skupina jajašaca u kontrolnim posudama prve generacije trebao bi iznositi najmanje 0,6 po ženki dodanoj u kavez za uzgoj;

— udio plodnih skupina jajašaca u svakom kavezu za uzgoj kontrolnih posuda prve generacije trebao bi iznositi najmanje 0,6;

— na kraju razdoblja izlaganja za obje generacije treba u svakoj posudi izmjeriti pH-vrijednost i koncentraciju otopljenog kisika. Koncentracija kisika trebala bi iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV ([1])), a pH-vrijednost vode iznad sedimenta trebala bi biti u rasponu od 6 do 9 u svim ispitnim posudama;

— temperatura vode ne bi se smjela razlikovati za više od ± 1,0 °C.

OPIS METODE

Ispitne posude i kavezi za uzgoj

11. Ličinke su izložene u staklenim laboratorijskim čašama od 600 ml promjera otprilike 8,5 cm (vidi Dodatak 5.). Prikladne su i druge posude, ali mora se zajamčiti da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. Površina sedimenta mora biti dovoljno velika da po svakoj ličinki bude od 2 do 3 cm^2 površine. Omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba biti otprilike 1: 4. Treba

([1]) Na temperaturi od 20 °C pri standardnom atmosferskom tlaku ASV u slatkoj vodi iznosi 9,1 mg/l (60 % jednako je 5,46 mg/l)

▼M6

upotrebljavati kaveze za uzgoj (najmanje 30 cm za svaku od triju dimenzija) s gazom (veličina otvora gaze otprilike 1 mm) na gornjoj strani i najmanje jednoj bočnoj strani (vidi Dodatak 5.). U svakom se kavezu radi polaganja jajašaca postavlja 21 posuda za kristalizaciju koja sadržava ispitnu vodu i sediment. Što se tiče posude za kristalizaciju, omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta trebao bi biti otprilike 1: 4. Nakon sakupljanja skupina jajašaca iz posude za kristalizaciju iste se stavljaju na mikrotitracijsku pločicu s 12 jažica (jedna skupina po jažici koja sadržava najmanje 2,5 ml vode iz posude za kristalizaciju obrađene spikingom) nakon čega se pločice pokrivaju poklopcem kako bi se spriječilo znatno isparavanje. Mogu se upotrebljavati i druge posude prikladne za čuvanje skupina jajašaca. Uz iznimku mikrotitracijskih pločica, sve ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u dodir s ispitnim sustavom trebali bi biti izrađeni u cijelosti od stakla ili nekog drugog kemijski inertnog materijala (npr. politetrafluoretilena).

Odabir vrste

12. Vrsta koju treba upotrebljavati u ovom ispitivanju po mogućnosti je *Chironomus riparius*. Može se upotrebljavati i vrsta *C. yoshimatsui*. Prikladna je i vrsta *C. dilutus*, ali njome je teže rukovati te je za nju potrebno dulje razdoblje ispitivanja. Pojedinosti o metodama uzgoja kultura nalaze se u Dodatku 2. za vrstu *C. riparius*. Podaci o uvjetima uzgoja kultura dostupni su i za vrste *C. dilutus* (5) i *C. yoshimatsui* (14). Mora se potvrditi identifikacija vrste prije ispitivanja, ali to nije potrebno prije svakog ispitivanja ako organizmi potječu iz kulture uzgojene u laboratoriju.

Sediment

13. Po mogućnosti bi se trebao upotrebljavati formulirani sediment (zvan još i obrađeni, umjetni ili sintetički sediment). Međutim, ako se upotrebljava prirodni sediment, isti je potrebno karakterizirati (barem pH-vrijednost, sadržaj organskog ugljika, a preporučuje se i određivanje drugih parametara kao što su omjer C/N i granulometrija) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli natjecati s ličinkama trzalaca ili ih jesti. Preporučuje se, prije ispitivanja, i priprema sedimenata sedam dana u uvjetima ispitivanja. Preporučuje se sljedeći formulirani sediment (1)(20)(21), kako je opisano u (1):

a. 4 – 5 % (suhe mase) treseta: što je moguće bliže pH-vrijednosti od 5,5 do 6,0; važno je da se upotrebljava treset u obliku praha, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 1 mm) i isključivo sušen na zraku;

b. 20 % (suhe mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %);

c. 75 – 76 % (suhe mase) kremenog pijeska (fini bi pijesak trebao prevladavati s više od 50 posto čestica između 50 i 200 μm);

d. Dodaje se deionizirana voda kako bi se dobila vlaga konačne smjese u rasponu 30 – 50 %;

e. Dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kakvoće ($CaCO_3$) kako bi se pH-vrijednost konačne smjese sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5;

f. Sadržaj organskog ugljika konačne smjese trebao bi iznositi 2 % (± 0,5 %) i treba se prilagoditi upotrebom odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c).

14. Izvor treseta, kaolinitske gline i pijeska trebao bi biti poznat. Potrebno je provjeriti jesu li komponente sedimenta kemijski kontaminirane (npr. teški metali, organoklorni spojevi, organofosforni spojevi itd.). Primjer pripreme formuliranog sedimenta opisan je u Dodatku 3. Prihvatljivo je

▼M6

i miješanje suhih sastojaka ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. plutanje čestica treseta) i da je treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljen.

Voda

15. Kao ispitna voda prikladna je svaka voda koja ima kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje koja su navedena u dodacima 2. i 4. Kao voda za uzgoj kultura i ispitna voda prikladna je svaka prikladna voda, prirodna voda (površinske ili podzemne vode), obrađena voda (vidi Dodatak 2.) ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor ako će trzalci u njoj preživjeti tijekom uzgoja kulture i ispitivanja, a da ne pokažu nikakve znakove stresa. Na početku ispitivanja pH-vrijednost ispitne vode trebala bi biti između 6 i 9, a ukupna tvrdoća ne viša od 400 mg/l kao $CaCO_3$. Međutim, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane kemikalije, potrebno je upotrebljavati vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije upotrebljavati medij Elendt M4). Tijekom cijele studije potrebno je upotrebljavati istu vrstu vode. Najmanje dvaput godišnje ili kada se sumnja da su se svojstva kakvoće vode navedena u Dodatku 4. znatno promijenila, potrebno je izmjeriti ta svojstva.

Radne otopine – voda obrađena spikingom

16. a. Ispitne koncentracije izračunavaju se na temelju koncentracija u vodenom stupcu, odnosno u vodi iznad sedimenta. Ispitne otopine u odabranim koncentracijama obično se pripremaju razrjeđivanjem radne otopine. Radne otopine potrebno je, po mogućnosti, pripremiti otapanjem ispitivane kemikalije u ispitnoj vodi. Možda će u nekim slučajevima biti potrebno upotrijebiti otapala ili dispergente kako bi se dobila prikladno koncentrirana radna otopina. Primjeri prikladnih otapala jesu aceton, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamid i trietilen glikol. Dispergenti koji se mogu upotrebljavati jesu Cremophor RH40, Tween 80, metil-celuloza 0,01 % i HCO-40. Koncentracija otapajućeg sredstva u konačnom ispitnom mediju trebala bi biti minimalna (odnosno $\leq$ 0,1 ml/l) i trebala bi biti ista u svim grupama. Kada se upotrebljava otapajuće sredstvo, ono ne smije imati nikakve znatne učinke na preživljavanje prema podacima kontrolne skupine s otapalom u usporedbi s podacima negativne kontrolne skupine s vodom. Međutim, potrebno je uložiti sve napore da se izbjegne upotreba takvih tvari.

Radne otopine – sediment obrađen spikingom

16.b. Sedimenti obrađeni spikingom odabrane koncentracije obično se pripremaju dodavanjem otopine ispitivane kemikalije izravno u sediment. Radna otopina ispitivane kemikalije otopljena u deioniziranoj vodi miješa se s formuliranim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi, može se otopiti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog otapala (npr. heksan, aceton ili kloroform). Ta se otopina potom miješa s 10 g finog kremenog pijeska za svaku ispitnu posudu. Otapalo se pusti da ispari i mora se u cijelosti ukloniti iz pijeska; potom se pijesak miješa s prikladnom količinom sedimenta. Samo lako hlapljiva sredstva mogu se upotrebljavati za otapanje, dispergiranje ili emulgiranje ispitivane kemikalije. Potrebno je imati na umu da se pijesak koji nastane miješanjem

▼M6

ispitivane kemikalije i pijeska mora uzeti u obzir prilikom pripreme sedimenta (odnosno sediment je stoga potrebno pripremiti s manje pijeska). Ispitivanu kemikaliju koja se dodaje u sediment potrebno je temeljito i ravnomjerno raspršiti u sedimentu. Ako je potrebno, mogu se analizirati i poduzorci kako bi se odredio stupanj homogenosti.

PLAN ISPITIVANJA

17. Plan ispitivanja odnosi se na odabir broja i raspored ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju, na broj ličinaka po posudi, na broj posuda za kristalizaciju i kaveza za uzgoj. Planovi za EC_x, NOEC i granično ispitivanje opisani su u nastavku.

Plan za regresijsku analizu

18. Ispitivanje mora obuhvaćati koncentraciju s učinkom (EC_x,) i raspon koncentracija unutar kojega je učinak ispitivane kemikalije od interesa, tako da se krajnji učinak ne ekstrapolira izvan granica dobivenih podataka. Potrebno je izbjegavati ekstrapolaciju znatno ispod najniže ili iznad najviše koncentracije. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona prema ispitnim metodama iz C.27. ili C.28. može biti korisno za odabir prikladnog raspona ispitnih koncentracija.

19. Za pristup EC_x potrebno je najmanje pet koncentracija i osam ponavljanja za svaku koncentraciju. Za svaku koncentraciju potrebno je upotrebljavati dva kaveza za uzgoj (A i B). Osam ponavljanja podijeljeno je u dvije skupine od četiri ponavljanja za primjenu u svakom kavezu za uzgoj. To spajanje ponavljanja potrebno je zbog broja mušica potrebnih u kavezu radi pouzdanih procjena razmnožavanja. Međutim, druga generacija ponovno ima osam ponavljanja koja se pokreću iz izloženih populacija u kavezima za uzgoj. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (iznimka se može učiniti u slučajevima kada krivulja odgovora na dozu ima plitak nagib). Broj ponavljanja u svakoj grupi može se sniziti na šest (tri za svaki kavez za uzgoj) ako se poveća broj ispitnih koncentracija različitih odgovora. Povećanje broja ponavljanja ili smanjivanje trajanja intervala ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti oko EC_x-a.

Plan za procjenu NOEC-a

20. Za pristup NOEC potrebno je upotrebljavati pet ispitnih koncentracija s najmanje osam ponavljanja (četiri za svaki kavez za uzgoj, A i B), a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva. Broj ponavljanja trebao bi biti dovoljan da osigura adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri razini značajnosti od 5 % (α = 0,05). Kod brzine razvoja i potencijalne i stvarne plodnosti obično je prikladna analiza varijance (ANOVA) nakon koje slijede Dunnettov test ili Williamsov test (22 – 25). Kod omjera preobrazbe i omjera spolova mogli bi biti prikladni Cochran-Armitageov test, Fisherov test (s Bonferronijevom korekcijom) ili Mantel-Haenszelov test.

Granično ispitivanje

21. Može se provesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrolna posuda ili kontrolne posude) ako se u fakultativnom preliminarnom testu za određivanje raspona ne vide nikakvi učinci do najveće koncentracije. Cilj graničnog ispitivanja jest naznačiti da su svi učinci toksičnosti ispitivane kemikalije utvrđeni na razinama većima od ispitivane granične koncentracije. Za vodu se predlaže 100 mg/l, a za sediment 1 000 mg/kg (suhe mase). Obično je potrebno najmanje osam ponavljanja i za grupu i za kontrolnu posudu. Potrebno je pokazati adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri

▼M6

razini značajnosti od 5 % (α = 0,05). Kod metričkog odgovora (npr. brzina razvoja) t-test prikladna je statistička metoda ako podaci zadovoljavaju zahtjeve tog ispitivanja (normalnost, homogene varijance). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, mogu se upotrebljavati t-test nejednake varijance ili neparametrijsko ispitivanje, kao što je Wilcoxon-Mann-Whitheyev test. Kod omjera preobrazbe prikladan je Fisherov test.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Priprema sustava voda/sediment (obrađivanje vode spikingom)

22. a. Formulirani sediment (vidi stavke 13. i 14. i Dodatak 3.) dodaje se u svaku ispitnu posudu i posudu za kristalizaciju kako bi se stvorio sloj od najmanje 1,5 cm (ili nešto manji u slučaju posude za kristalizaciju), ali najviše 3 cm. Voda (vidi stavak 15.) se dodaje tako da omjer dubine sloja sedimenta i dubine vode ne premašuje 1: 4. Nakon pripreme ispitnih posuda sustav voda/sediment potrebno je blago dozračivati otprilike sedam dana prije dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja prve i druge generacije (vidi stavak 14. i Dodatak 3.). Sustav voda/sediment u posudama za kristalizaciju ne dozračuje se tijekom ispitivanja jer nije potrebno podržati preživljavanje ličinaka (skupine jajašaca sakupljaju se prije valjenja). Kako bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendiranje finog materijala tijekom dodavanja ispitne vode u vodeni stupac, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega lijeva voda. Disk se miče odmah nakon toga. Prikladni bi mogli biti i drugi predmeti.

Priprema sustava voda/sediment (sediment obrađen spikingom)

22.b. Sedimenti obrađeni spikingom koji su pripremljeni u skladu sa stavkom 16.b. stavljaju se u posude i posudu za kristalizaciju pa se dodaje voda iznad sedimenta, i to u omjeru sedimenta i vode 1: 4. Dubina sloja sedimenta trebala bi se kretati u rasponu od 1,5 do 3 cm (može biti nešto manja u slučaju posude za kristalizaciju). Kako bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendiranje finog materijala tijekom dodavanja ispitne vode u vodeni stupac, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega lijeva voda, a disk se miče odmah nakon toga. Prikladni bi mogli biti i drugi predmeti. Kad se pripremi sediment postupkom spikinga s vodom iznad sedimenta, poželjno je dopustiti razdiobu ispitivane kemikalije iz sedimenta u tekuće stanje (4)(5)(7)(18). To je po mogućnosti potrebno učiniti u uvjetima temperature i dozračivanja koji se upotrebljavaju u ispitivanju. Prikladno vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i kemikaliju, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, a u rijetkim slučajevima i do pet tjedana. Budući da je time ostavljeno dovoljno vremena za razgradnju brojnih kemikalija, ne čeka se uravnoteženje, ali preporučuje se vrijeme uravnoteženja od 48 sati. Međutim, vrijeme uravnoteženja može se produljiti ako je poznato da je vrijeme polurazgradnje kemikalije dugo (vidi stavak 8.). Na kraju tog dodatnog vremena uravnoteženja potrebno je izmjeriti koncentraciju ispitivane kemikalije u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i u sedimentu, barem u najvišoj koncentraciji i u jednoj nižoj (vidi stavak 38.). Ta analitička određivanja ispitivane kemikalije omogućuju izračun bilance mase i izražavanje rezultata na temelju izmjerenih koncentracija.

23. Ispitne posude trebale bi biti pokrivene (npr. staklenim pločicama). Ako je potrebno, tijekom studije u izvorni volumen vode nadolijeva se još vode kako bi se nadomjestilo isparavanje. Za to je potrebno upotrebljavati destiliranu ili deioniziranu vodu kako bi se spriječilo stvaranje soli.

▼M6

Posude za kristalizaciju u kavezima za uzgoj nisu pokrivene i može ih se, ali i ne treba prilagoditi kako bi se nadomjestio gubitak vode tijekom razdoblja ispitivanja s obzirom na to da su skupine jajašaca samo u dodiru s vodom otprilike jedan dan i posude se upotrebljavaju samo tijekom kratke faze ispitivanja.

Dodavanje ispitnih organizama

24. Od četiri do pet dana prije dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja prve generacije mase jajašaca potrebno je izvaditi iz kultura i staviti u male posude na hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Može se upotrebljavati stara hranjiva podloga iz matične kulture ili svježe pripremljena hranjiva podloga za uzgoj kulture. U svakom slučaju, hranjivoj podlozi za uzgoj kulture potrebno je dodati manju količinu hrane, npr. nekoliko kapljica filtrata suspenzije fino mljevenih pahuljica riblje hrane (vidi Dodatak 2.). Potrebno je upotrebljavati samo svježe položene mase jajašaca. Valjenje ličinaka obično počinje nekoliko dana nakon polaganja jajašaca (od dva do tri dana za *C. riparius* na 20 °C i od jednog do četiri dana za *C. dilutus* na 23 °C i za *C. yoshimatsui* na 25 °C), a ličinke se razvijaju u četiri stadija razvoja, od kojih svaki traje od četiri do osam dana. U ispitivanju je potrebno upotrebljavati ličinke u prvom stadiju razvoja (najviše 48 sati poslije valjenja). Stadij razvoja ličinaka moguće je provjeriti s pomoću širine kapsule glave (7).

25. Dvadeset ličinaka iz prvog stadija razvoja stavlja se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava sustav voda/sediment, i to s pomoću tupe pipete. Dozračivanje vode zaustavlja se tijekom dodavanja ličinaka u ispitne posude i potrebno je da tako ostane još 24 sata nakon dodavanja ličinaka (vidi stavak 32.). Prema upotrijebljenom planu ispitivanja (vidi stavke 19. i 20.) broj ličinaka po koncentraciji iznosi najmanje 120 (šest ponavljanja po koncentraciji) za pristup EC_X i 160 za pristup NOEC (osam ponavljanja po koncentraciji). U planu sa sedimentom obrađenim spikingom izlaganje počinje nakon dodavanja ličinaka.

Obrađivanje vode iznad sedimenta spikingom

26. Dvadeset i četiri sata nakon dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja prve generacije ispitivana kemikalija dodaje se spikingom u vodeni stupac iznad sedimenta i ponovno se osigurava blago dozračivanje (za moguće izmjene plana ispitivanja vidi stavak 7.). Male količine radnih otopina ispitivane kemikalije stavljaju se ispod površine vode pipetom. Voda iznad sedimenta trebala bi se potom pažljivo promiješati kako se sediment ne bi umiješao. U planu s vodom obrađenom spikingom izlaganje počinje obrađivanjem vode spikingom (odnosno jedan dan nakon dodavanja ličinaka).

Sakupljanje preobraženih odraslih životinja

27. Preobražene mušice prve generacije sakupljaju se barem jedanput, no po mogućnosti dvaput na dan (vidi točku 36.) iz ispitnih posuda s pomoću aspiratora, sisaljke ili sličnog uređaja (vidi Dodatak 5.). Potrebno je posebno paziti kako se ne bi ozlijedilo odrasle životinje. Sakupljene mušice iz četiri ispitne posude unutar jedne grupe otpuštaju se u kavez za uzgoj kojem su prethodno dodijeljene. Na dan prve preobrazbe (mužjaka) posude za kristalizaciju obrađuju se spikingom dodavanjem male količine radne otopine ispitivane kemikalije s pomoću pipete ispod površine vode (plan za vodu obrađenu spikingom). Voda iznad sedimenta trebala bi se potom pažljivo promiješati kako se sediment ne bi umiješao. Koncentracija ispitivane kemikalije u posudi za kristalizaciju nominalno je jednaka onoj u ispitnim posudama koje su dodijeljene tom specifičnom

▼M6

kavezu za uzgoj. U slučaju plana sa sedimentom obrađenim spikingom posude za kristalizaciju pripremaju se oko 11. dana nakon početka izlaganja (odnosno nakon dodavanja ličinaka prve generacije) kako bi se uravnotežile kroz otprilike 48 sati prije dobivanja prvih skupina jajašaca.

28. Skupine jajašaca sakupljaju se iz posude za kristalizaciju u kavezu za uzgoj s pomoću pincete ili tupe pipete. Svaka se skupina jajašaca stavlja u posudu u kojoj se nalazi hranjiva podloga za uzgoj kulture iz posude za kristalizaciju iz koje je sakupljena (npr. jažica mikrotitracijske pločice s 12 jažica zajedno s najmanje 2,5 ml hranjive podloge). Posude sa skupinama jajašaca pokrivaju se poklopcem kako bi se spriječilo znatno isparavanje. Skupine jajašaca čuvaju se radi promatranja najmanje šest dana nakon što su proizvedene kako bi ih se moglo razvrstati u skupinu plodnih ili neplodnih jajašaca.

Za početak druge generacije iz svakog se kaveza za uzgoj odabiru najmanje tri, no po mogućnosti šest plodnih skupina jajašaca i s određenom hranom omogućuje se njihovo valjenje. Te skupine jajašaca trebale su biti proizvedene na vrhuncu njihova polaganja do kojeg obično dolazi oko 19. dana ispitivanja u kontrolnim posudama. U idealnim okolnostima druga generacija svih grupa pokreće se istog dana, no zbog učinaka kemikalije na razvoj ličinaka to možda neće uvijek biti moguće. U tom slučaju veće koncentracije mogu biti pokrenute kasnije nego grupe nižih koncentracija i kontrolne posude s otapalom.

29. a. U planu s vodom obrađenom spikingom sustav voda/sediment za drugu generaciju priprema se dodavanjem spikingom ispitivane kemikalije u vodeni stupac iznad sedimenta otprilike jedan sat prije dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja u ispitne posude. Male količine otopina ispitivane kemikalije stavljaju se ispod površine vode pipetom. Voda iznad sedimenta trebala bi se potom pažljivo promiješati kako se sediment ne bi umiješao. Nakon obrađivanja spikingom osigurava se blago dozračivanje.

29.b. U planu sa sedimentom obrađenim spikingom posude za izlaganje koje sadržavaju sustav voda/sediment za drugu generaciju pripremaju se na isti način kao za prvu generaciju.

30. Dvadeset ličinaka u prvom stadiju razvoja (najviše 48 sati nakon valjenja) druge generacije stavlja se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava sustav voda/sediment obrađen spikingom, i to s pomoću tupe pipete. Potrebno je zaustaviti dozračivanje vode tijekom dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja u ispitne posude i tako treba ostati još 24 sata nakon dodavanja ličinaka. Prema upotrijebljenom planu ispitivanja (vidi stavke 19. i 20.) broj ličinaka po koncentraciji iznosi najmanje 120 (šest ponavljanja po koncentraciji) za pristup EC_X i 160 za pristup NOEC (osam ponavljanja po koncentraciji).

Hrana

31. Potrebno je hraniti ličinke u ispitnim posudama, po mogućnosti svakodnevno ili najmanje triput tjedno. Riblja hrana (suspenzija u vodi ili fino mljevena hrana, npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll; vidi pojedinosti u Dodatku 2.) u količini od 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg za *C. yoshimatui*) dnevno po ličinki prikladna je količina hrane za mlade ličinke tijekom prvih deset dana njihova razvoja. Za starije će ličinke biti potrebno malo više hrane: Od 0,5 do 1 mg dnevno po ličinki trebalo bi biti dostatno za ostatak ispitivanja. Porcije hrane potrebno je smanjiti u svim grupama ako se primijeti rast gljivica ili ako se primijeti smrtnost u kontrolnim posudama. Ako se ne može zaustaviti rast gljivica, ispitivanje je potrebno ponoviti.

Toksikološka važnost izlaganja oralnim putem općenito je veća kod kemikalija visokog afiniteta prema organskom ugljiku ili kemikalija koje se

▼M6

vežu sa sedimentom kovalentnim vezama. Stoga kod ispitivanja kemikalija s takvim svojstvima količina hrane neophodna za osiguranje preživljavanja i prirodnog rasta ličinaka može se dodati formuliranom sedimentu prije razdoblja stabilizacije, ovisno o regulatornim zahtjevima. Kako bi se spriječilo pogoršanje kvalitete vode, umjesto riblje hrane potrebno je upotrebljavati biljni materijal, npr. može se dodati 0,5 % (suha masa) fino usitnjenog lišća npr. velike koprive (*Urtica dioica*), duda (*Morus alba*), bijele djeteline (*Trifolium repens*), špinata (*Spinacia oleracea*) ili nekog drugog biljnog materijala (*Cerophyl* ili alfa-celuloze). Dodavanje cjelovite porcije organskog izvora hrane u sediment prije njegova obrađivanja spikingom niti je beznačajno u odnosu na kvalitetu vode i biološki učinak (21) niti čini standardiziranu metodu, no najnovije studije upućuju na uspješnost ove metode (19)(26). Odrasle mušice u kavezu za uzgoj obično ne trebaju hranu, no potencijalna i stvarna plodnost povećavaju se kad se preobraženim odraslim životinjama (34) kao izvor hrane ponudi vuneni podložak namočen u zasićenu šećernu otopinu.

Uvjeti za inkubaciju

32. Blago dozračivanje vode iznad sedimenta u ispitnim posudama osigurava se 24 sata poslije dodavanja ličinaka u prvom stadiju razvoja obje generacije i nastavlja se tijekom cijelog ispitivanja (potrebno je pobrinuti se da koncentracija otopljenog kisika ne padne ispod 60 % ASV-a). Dozračivanje se vrši putem staklene Pasteurove pipete čiji je ispusni dio pričvršćen 2 – 3 cm iznad sloja sedimenta puštajući nekoliko mjehurića u sekundi. Pri ispitivanju hlapljivih kemikalija potrebno je paziti da se ne dozračuje sustav sediment/voda, a istovremeno je potrebno ispuniti validacijski kriterij od najmanje 60 % ASV-a (stavak 10.). Ostale upute nalaze se u (16).

33. Ispitivanje koje uključuje vrstu *C. riparius* provodi se na stalnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za vrste *C. dilutus* i *C. yoshimatsui* preporučene temperature su 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Upotrebljava se fotoperiod od 16 sati, a jačina svjetlosti trebala bi biti od 500 do 1 000 luksa. U slučaju kaveza za uzgoj može se uključiti joj jedan sat u fazi zore ili sumraka.

Trajanje izlaganja

34. Plan s vodom obrađenom spikingom: Razdoblje izlaganja prve generacije počinje nakon što se ispitivana kemikalija doda spikingom u vodu iznad sedimenta u ispitnim posudama (a to je jedan dan nakon stavljanja ličinka – za moguće izmjene plana izlaganja vidi stavak 7.). Izlaganje druge generacije ličinaka počinje odmah jer ih se stavlja u sustav voda/sediment koji je već obrađen spikingom. Maksimalno trajanje izlaganja za prvu generaciju jest 27 dana, a za drugu generaciju 28 dana (prva generacija ličinaka provodi jedan dan u posudama bez izlaganja) za vrste *C. riparius* i *C. yoshimatsui*. Uzimajući u obzir preklapanje, ukupno trajanje ispitivanja jest otprilike 44 dana. Za vrstu *C. dilutus* maksimalno trajanje izlaganja jest 64 dana za prvu i 65 dana za drugu generaciju. Ukupno trajanje jest otprilike 100 dana.

Plan sa sedimentom obrađenim spikingom: izlaganje počinje nakon dodavanja ličinaka i traje maksimalno 28 dana za obje generacije za vrste *C. riparius* i *C. yoshimatsui* i maksimalno 65 dana za obje generacije za vrstu *C. dilutus*.

Opažanja

Preobrazba

35. Određuju se vrijeme razvoja i ukupni broj živih muških i ženskih mušica koje su se u cijelosti preobrazile za obje generacije. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima i tankom tijelu.

▼M6

36. Ispitne posude obiju generacija potrebno je promatrati najmanje triput tjedno kako bi se vizualno procijenilo svako neuobičajeno ponašanje ličinaka (npr. napuštanje sedimenta, neuobičajeno plivanje) u usporedbi s kontrolnim posudama. Tijekom razdoblja preobrazbe, koje počinje otprilike 12 dana nakon dodavanja ličinaka za vrste *C. riparius* i *C. yoshimatsui* (nakon 20 dana za vrstu *C. dilutus*), preobražene se mušice broje i utvrđuje im se spol barem jedanput, no po mogućnosti dvaput na dan (rano ujutro i kasno poslijepodne). Nakon utvrđivanja mušice prve generacije pažljivo se uklanjaju iz posuda i prenose u kavez za uzgoj. Mušice druge generacije uklanjaju se i usmrćuju nakon utvrđivanja. Sve skupine jajašaca stavljene u ispitne posude prve generacije potrebno je sakupiti pojedinačno i prenijeti s najmanje 2,5 ml vode iz koje su prikupljene na mikrotitracijske pločice s 12 jažica (ili druge prikladne posude) prekrivene poklopcem kako bi se spriječilo znatno isparavanje. Potrebno je bilježiti i broj mrtvih ličinaka i vidljivih kukuljica koje se nisu uspjele preobraziti. Primjeri kaveza za uzgoj, ispitne posude i sisaljke navedeni su u Dodatku 5.

Razmnožavanje

37. Učinci na razmnožavanje procjenjuju se s pomoću broja skupina jajašaca koje su proizvele mušice prve generacije i stvarne plodnosti tih skupina jajašaca. Skupine jajašaca sakupljaju se jedanput na dan iz posude za kristalizaciju koja se stavlja u svaki spremnik za uzgoj. Skupine jajašaca potrebno je sakupljati i prenositi s najmanje 2,5 ml vode iz koje su prikupljene na mikrotitracijsku pločicu s 12 jažica (jedna skupina jajašaca u svaku jažicu) ili u druge prikladne posude pokrivene poklopcem kako bi se spriječilo znatno isparavanje. Sljedeća se svojstva dokumentiraju za svaku skupinu jajašaca: dan nastanka, veličina (uobičajena, odnosno 1,0 ± 0,3 cm ili mala; obično ≤ 0,5 cm) i struktura (uobičajena = oblik banane sa spiralnim nizom jajašaca i neuobičajena, npr. nespiralni niz jajašaca) te stvarna plodnost (plodna ili neplodna). Stvarna plodnost skupine jajašaca procjenjuje se u razdoblju od šest dana nakon što su proizvedena. Skupina jajašaca smatra se plodnom ako se izlegnu životinje iz najmanje jedne trećine jajašaca. Ukupan broj ženki stavljenih u kavez za uzgoj upotrebljava se za izračun broja skupina jajašaca po ženki i broja plodnih skupina jajašaca po ženki. Ako je potrebno, broj jajašaca u bilo kojoj skupini jajašaca može se procijeniti bez da ih se uništava s pomoću metode brojenja prstena (više pojedinosti u 32 i 33).

Analitička mjerenja

Koncentracija ispitivane kemikalije

38. Kao minimum, na početku izlaganja (po mogućnosti sat vremena nakon dodavanja u slučaju obrađivanja vode spikingom) i na kraju ispitivanja potrebno je analizirati uzorke vode iznad sedimenta, porne vode i sedimenta, i to u najvišoj koncentraciji i u nekoj nižoj. To vrijedi za posude obiju generacija. Iz posuda za kristalizaciju u kavezu za uzgoj analizira se samo voda iznad sedimenta s obzirom na to da skupine jajašaca dolaze u dodir samo s njom (u slučaju plana sa sedimentom obrađenim spikingom može se uzeti u obzir analitička potvrda koncentracije sedimenta). Prema potrebi mogu se provesti dodatna mjerenja sedimenta, porne vode ili vode iznad sedimenta tijekom ispitivanja. Ta određivanja koncentracije ispitivane kemikalije daju informacije o ponašanju/razdiobi ispitivane kemikalije u sustavu voda/sediment. Uzorkovanje sedimenta i porne vode na početku i tijekom ispitivanja (vidi stavak 39.) zahtijeva dodatne ispitne posude za provođenje analitičkih određivanja. Mjerenja u sedimentu u

▼M6

planu s vodom obrađenom spikingom možda neće biti potrebna ako je razdioba ispitivane kemikalije između vode i sedimenta jasno određena u okviru studije vode/sedimenta u usporedivim uvjetima (npr. omjer sedimenta i vode, vrsta primjene, sadržaj organskog ugljika u sedimentu) ili ako su izmjerene koncentracije u vodi iznad sedimenta na razini između 80 i 120 % nominalnih ili izmjerenih početnih koncentracija.

39. Kada se provode posredna mjerenja (npr. 7. dana i/ili 14. dana) te ako su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda, a da to pritom ne utječe na ispitni sustav, analitička određivanja potrebno je provoditi na uzorcima iz dodatnih ispitnih posuda koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisustvo ispitnih organizama), ali koje se ne upotrebljavaju za biološka opažanja.

40. Preporučeni postupak za izoliranje međuprostorne (porne) vode jest centrifugiranje na npr. 10 000 g na 4 °C tijekom 30 min. Međutim, ako se utvrdi da se ispitivana kemikalija ne adsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi jer je uzorak premalen.

Fizikalno-kemijski parametri

41. Na prikladan način potrebno je izmjeriti pH-vrijednost, otopljeni kisik u ispitnoj vodi i temperaturu vode u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju (vidi stavak 10.). Tvrdoću i amonijak potrebno je mjeriti u kontrolnim posudama i u jednoj ispitnoj posudi te posudi za kristalizaciju u najvišoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

42. Svrha ovog ispitivanja životnog ciklusa jest odrediti učinak ispitivane kemikalije na razmnožavanje i, za dvije generacije, na brzinu razvoja i ukupan broj živih mužjaka i ženki mušica koje su se u cijelosti preobrazile. Za potrebe omjera preobrazbe potrebno je ujediniti podatke o mužjacima i ženkama. Ako ne postoje statistički značajne razlike između osjetljivosti brzine razvoja suprotnih spolova, rezultati koji se odnose na mužjake i ženke mogu se ujediniti radi statističke analize.

43. Koncentracije s učinkom izražene kao koncentracije u vodi iznad sedimenta (za vodu obrađenu spikingom) ili u sedimentu (za sediment obrađen spikingom) obično se izračunavaju na temelju izmjerenih koncentracija na početku izlaganja (vidi stavak 38.). Stoga se, za vodu obrađenu spikingom, za svaku grupu izračunava prosjek koncentracija obično izmjerenih na početku izlaganja u vodi iznad sedimenta u posudama za obje generacije i onih u posudama za kristalizaciju. Za sediment obrađen spikingom, za svaku grupu izračunava se prosjek koncentracija obično izmjerenih na početku izlaganja u posudama za obje generacije (i fakultativno onih u posudama za kristalizaciju).

44. Za izračun procijenjene vrijednosti, odnosno EC_x, statistički podaci za svaku posudu i za svaki kavez za uzgoj mogu se upotrijebiti kao stvarna ponavljanja. U izračunu intervala pouzdanosti za bilo koji EC_x u obzir je potrebno uzeti varijabilnost među posudama ili je potrebno pokazati da je ta varijabilnost toliko neznatna da se može ignorirati. Kada se model prilagođava metodi najmanjih kvadrata, na statističke podatke za svaku posudu potrebno je primijeniti transformaciju kako bi se poboljšala homogenost varijance. Međutim, vrijednosti EC_x trebale bi se izračunati tek nakon što se odgovor transformira natrag u izvornu vrijednost (31).

▼M6

45. Ako je cilj statističke analize odrediti NOEC testiranjem hipoteze, u obzir je potrebno uzeti varijabilnost među posudama koju jamči upotreba metoda ANOVA-e (npr. postupaka Williamsova i Dunnettova testa). Williamsov test bio bi prikladan ako se u teoriji očekuje odgovor na monotoničnu dozu, a Dunnettov test bio bi prikladan ako se odbaci hipoteza o monotoničnosti. Kao druga mogućnost, u situacijama kršenja uobičajenih pretpostavki ANOVA-e (31), mogu biti prikladna i robusnija ispitivanja (27).

Omjer preobrazbe

46. Omjeri preobrazbe jesu kvantalni podaci i mogu se analizirati Cochran-Armitageovim testom koji se primjenjuje postupnim snižavanjem kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad se ti podaci slažu s tim očekivanjem. Ako to nije slučaj, može se upotrebljavati Fisherov test ili Mantel-Haenszelov test s Bonferroni-Holmovim prilagođenim p-vrijednostima. Ako ima dokaza za još veću varijabilnost između ponavljanja u istoj koncentraciji nego što bi to naznačila binomna distribucija (često zvana i „ekstra-binomna" varijacija), potrebno je primijeniti robusni Cochran-Armitageov ili Fisherov test kakvi su predloženi u (27).

Određuje se broj živih mušica (mužjaci i ženke) preobraženih po posudi, n_e, koji se onda dijeli brojem uvedenih ličinaka, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

pri čemu je:

ER = omjer preobrazbe

n_e = broj živih mušica preobraženih po posudi

n_a = broj uvedenih ličinaka po posudi (obično 20)

Ako je n_e veći od n_a (odnosno ako se nenamjerno uvede veći broj ličinaka od predviđenog), n_a potrebno je izjednačiti s n_e.

47. Najprikladniji alternativni pristup za velike uzorke, kada postoji ekstra-binomna varijanca, jest tretirati omjer preobrazbe kao kontinuirani odgovor te primijeniti postupke u skladu s tim ER podacima. Veliki uzorak ovdje se definira kao broj preobraženih mušica i broj nepreobraženih mušica veći od pet, i to po ponavljanju (posudi).

48. Za primjenu metoda ANOVA-e vrijednosti ER-a moraju se prvo transformirati arkus sinus drugi korijen transformacijom ili Tukey-Freemanovom transformacijom kako bi se dobila približna normalna distribucija i ujednačile varijance. Kad se upotrebljavaju apsolutne frekvencije, može se primijeniti Cochran-Armitageov, Fisherov (Bonferronijev) ili Mantel-Haenszelov test. Arkus sinus drugi korijen transformacija primjenjuje se tako što se uzme inverzni sinus ($\sin^{-1}$) drugog korijena ER-a.

49. Za omjere preobrazbe vrijednosti EC_x računaju se regresijskom analizom (npr. probit, logit ili Weibullov model (28)). Ako regresijska analiza ne uspije (npr. kad imamo manje od dva djelomična odgovora), mogu se upotrebljavati druge neparametrijske metode, kao što je pomični prosjek ili jednostavna interpolacija.

Brzina razvoja

50. Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji raspon vremena između uvođenja ličinaka (nulti dan ispitivanja) i njihove preobrazbe u pokusnu skupinu mušica (za izračun stvarnog vremena razvoja potrebno je u obzir

▼M6

uzeti dob ličinaka u vrijeme njihova uvođenja). Brzina razvoja (jedinica: 1/dan) recipročna je vremenu razvoja i predstavlja dio razvoja ličinaka koji se odvija tijekom jednog dana. Brzina razvoja preferira se za procjenu ovih studija o toksičnosti sedimenta jer je njezina varijanca niža, a homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u usporedbi s vremenom razvoja. Stoga se mogu upotrebljavati moćni postupci parametrijskih ispitivanja s brzinom razvoja radije nego s vremenom razvoja. Za brzinu razvoja kao kontinuirani odgovor mogu se procijeniti vrijednosti EC_x regresijskom analizom (npr. (29), (30)). NOEC za srednju brzinu razvoja može se odrediti metodama ANOVA-e, npr. Williamsovim ili Dunnettovim testom. Budući da se mužjaci preobraze ranije nego ženke, odnosno imaju veću brzinu razvoja, logično je izračunati brzinu razvoja za svaki spol zasebno uz izračun brzine razvoja za ukupni broj mušica.

51. U svrhe statističkog ispitivanja pretpostavlja se da se broj mušica zamijećen na dan pregleda x preobrazio u srednjem vremenskom intervalu između dana x i dana x – l (l = trajanje intervala pregleda, obično jedan dan). Srednja brzina razvoja po posudi ($\bar{x}$) računa se prema:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

pri čemu je:

$\bar{x}$: srednja brzina razvoja po posudi

i: indeks intervala pregleda

m: maksimalni broj intervala pregleda

f_i: broj mušica preobraženih u intervalu pregleda i

n_e: ukupni broj mušica preobraženih na kraju pokusa (Σf_i)

x_i: brzina razvoja mušica preobraženih u intervalu i

$$x_i = 1/\text{dan}_i - \frac{l_i}{2}$$

pri čemu je:

dan_i: dan pregleda (dana od uvođenja ličinaka)

l_i: trajanje intervala pregleda i (dani, obično 1 dan)

Omjer spolova

52. Omjeri spolova kvantalni su podaci i stoga ih je potrebno procijeniti Fisherovim testom ili drugim prikladnim metodama. Prirodan omjer spolova vrste *C. riparius* jest jedan, odnosno jednak je broj mužjaka i ženki. Podacima o omjeru spolova potrebno je postupati jednako za obje generacije. Budući da je maksimalni broj mušica po posudi (odnosno 20)

▼M6

premalen za značajnu statističku analizu, ukupan broj živih mušica koje su se u cijelosti preobrazile za svaki spol dobiva se zbrajanjem svih posuda u jednoj grupi. Ti nepretvoreni podaci ispituju se u usporedbi s podacima kontrolne posude s otapalom ili svih kontrolnih posuda u tablici kontingencije 2 × 2.

Razmnožavanje

53. Razmnožavanje, kao potencijalna plodnost, računa se kao broj skupina jajašaca po ženki. Točnije, ukupan broj skupina jajašaca dobivenih u kavezu za uzgoj dijeli se s ukupnim brojem živih i nepovrijeđenih ženki stavljenih u taj kavez. NOEC za potencijalnu plodnost može se odrediti metodama ANOVA-e, npr. Williamsovim ili Dunnettovim testom.

54. Stvarna plodnost skupine jajašaca upotrebljava se za kvantificiranje broja plodnih skupina jajašaca po ženki. Ukupan broj plodnih skupina jajašaca proizvedenih u kavezu za uzgoj dijeli se s ukupnim brojem živih i nepovrijeđenih ženki stavljenih u taj kavez. NOEC za stvarnu plodnost može se odrediti metodama ANOVA-e, npr. Williamsovim ili Dunnettovim testom.

Izvješće o ispitivanju

55. Izvješće o ispitivanju trebalo bi obuhvaćati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalna priroda i fizikalno-kemijska svojstva (topljivost u vodi, tlak pare, log K_{ow},podjelni koeficijent u tlu (ili u sedimentu ako postoji), stabilnost u vodi i sedimentu itd.);

— podaci za identifikaciju kemikalije (opći naziv, kemijski naziv, strukturna formula, CAS broj itd.), uključujući čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane kemikalije.

Ispitne vrste:

— upotrijebljeni ispitni organizmi: vrsta, znanstveni naziv, izvor organizama i uvjeti uzgoja;

— informacije o postupanju s masama jajašaca i ličinkama;

— informacije o postupanju s preobraženim odraslim životinjama prve generacije s pomoću sisaljke itd. (vidi Dodatak 5.)

— dob ispitnih organizama u vrijeme stavljanja u ispitne posude prve i druge generacije.

Uvjeti ispitivanja:

— upotrijebljeni sediment, odnosno prirodni ili formulirani (umjetni) sediment;

— prirodni sediment: lokacija i opis mjesta uzorkovanja sedimenta, uključujući, po mogućnosti, povijest onečišćenja, svojstva sedimenta: pH-vrijednost, sadržaj organskog ugljika, omjer C/N i granulometriju (ako je prikladno).

— formulirani sediment: priprema, sastojci i svojstva (sadržaj organskog ugljika, pH-vrijednost, vlaga itd. izmjereni na početku ispitivanja);

— priprema ispitne vode (ako se upotrebljava obrađena voda) i svojstva (koncentracija kisika, pH-vrijednost, tvrdoća itd. izmjereni na početku ispitivanja);

▼M6

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta za ispitne posude i posude za kristalizaciju;

— volumen vode iznad sedimenta i porne vode, masa mokrog sedimenta s i bez porne vode za ispitne posude i posude za kristalizaciju;

— ispitne posude (materijal i veličina);

— posude za kristalizaciju (materijal i veličina);

— kavezi za uzgoj (materijal i veličina)

— metoda pripreme radnih otopina i ispitnih koncentracija za ispitne posude i posude za kristalizaciju;

— dodavanje ispitivane kemikalije u ispitne posude i posude za kristalizaciju: ispitne koncentracije, broj ponavljanja i otapala ako je potrebno;

— uvjeti za inkubaciju za ispitne posude: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti, dozračivanje (mjehurića po sekundi);

— uvjeti za inkubaciju za kaveze za uzgoj i posude za kristalizaciju: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti;

— uvjeti za inkubaciju za skupine jajašaca na mikrotitracijskim pločicama (ili u drugim posudama): temperatura, ciklus i jačina svjetlosti:

— detaljne informacije o hranjenju, uključujući vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

Rezultati:

— nominalne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju;

— kakvoća vode u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju, odnosno pH-vrijednost, temperatura, otopljeni kisik, tvrdoća i amonijak;

— zamjena isparene ispitne vode za ispitne posude, ako je bilo;

— broj preobraženih mužjaka i ženki mušica po posudi i po danu za prvu i drugu generaciju;

— omjer spolova živih mušica koje su se u cijelosti preobrazile po grupi za prvu i drugu generaciju

— broj ličinaka koje se nisu preobrazile kao mušice po posudi za prvu i drugu generaciju;

— postotak/udio preobrazbe po ponavljanju i ispitnoj koncentraciji (mužjaci i ženke mušica zajedno) za prvu i drugu generaciju;

— srednja brzina razvoja živih mušica koje su se u cijelosti preobrazile po ponavljanju i brzini tretmana (mužjaci i ženke mušica odvojeno i zajedno) za prvu i drugu generaciju;

— broj skupina jajašaca položenih u posude za kristalizaciju po kavezu za uzgoj i danu;

▼**M6**

— svojstva svake skupine jajašaca (veličina, oblik i stvarna plodnost);

— potencijalna plodnost – ukupan broj skupina jajašaca po ukupnom broju ženki stavljenih u kavez za uzgoj;

— stvarna plodnost – ukupan broj plodnih skupina jajašaca po ukupnom broju ženki stavljenih u kavez za uzgoj;

— procjene toksičnih krajnjih učinaka, npr. EC_x (i s time povezani intervali pouzdanosti), NOEC i statističke metode upotrijebljene za njihovo određivanje;

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjecaj na rezultate ispitivanja nastao uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

(1) Poglavlje C.27. ovog Priloga, Ispitivanje toksičnosti trzalaca (*chironomidae*) u vodi iz sedimenta sa sedimentom obrađenim spikingom.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999.), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311. – 322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994.), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. kolovoz 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993.), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009.), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997.), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, prosinac 1997.

(7) US-EPA (2000.), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, drugo izdanje, EPA 600/R-99/064, ožujak 2000., Izmjene prvog izdanja od lipnja 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996.), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996.), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996.), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006.), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662. – 2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007.), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221. – 230.

(13) Sugaya, Y. (1997.), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345. – 350.

(14) Kawai, K. (1986.), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47. – 57.

(15) Poglavlje C.27. ovog Priloga, Ispitivanje toksičnosti trzalaca (*chironomidae*) u vodi iz sedimenta sa sedimentom obrađenim spikingom.

(16) OECD (2000.), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000.)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995.), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, rujan 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005.), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353. – 361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994.), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163. – 1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995.), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291. – 3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964.), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096. – 1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964.), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482. – 491.

(24) Williams, D.A. (1971.), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103. – 117.

(25) Williams, D.A. (1972.), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510. – 531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009.), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94. – 102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992.), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577. – 585.

(28) Christensen, E.R. (1984.), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213. – 221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992.), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485. – 1494.

(30) Slob, W. (2002.), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298. – 312.

(31) OECD (2006.), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997.), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165. – 1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007.), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1. – 9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Dodatak 1

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije:

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Formulirani sediment ili obrađeni, umjetni ili sintetički sediment jest smjesa materijala koja se upotrebljava za oponašanje fizikalnih svojstava prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta jest voda koja se u ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Međuprostorna voda ili porna voda jest voda u prostoru između sedimenta i čestica tla.

Voda obrađena spikingom jest ispitna voda u koju je dodana ispitivana kemikalija.

Ispitivana kemikalija jesu sve tvari ili smjese koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

▼M6

Dodatak 2.

Preporuke za uzgoj kulture *Chironomus riparius*

1. Ličinke vrste *Chironomus* mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim spremnicima. Fini kremeni pijesak nanese se u tankom sloju dubine oko 5 do 10 mm po dnu spremnika. Pokazalo se i da je dijatomejska zemlja (npr. Merck, Art 8117) prikladan supstrat (dostatan je tanji sloj od svega nekoliko mm). Potom se dodaje prikladna voda u dubini od nekoliko centimetara. Vodu je potrebno nadolijevati po potrebi kako bi se zamijenila voda izgubljena isparavanjem i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može zamijeniti. Potrebno je osigurati blago dozračivanje. Posude za uzgoj ličinaka potrebno je držati u prikladnom kavezu koji će spriječiti bijeg preobraženih odraslih životinja. Kavez bi trebao biti dovoljno velik da se preobražene odrasle životinje mogu rojiti; u suprotnome možda neće doći do kopulacije (minimalno oko 30 x 30 x 30 cm).

2. Kaveze je potrebno držati na sobnoj temperaturi ili u prostoriji s konstantnim okolišem na 20 ± 2 °C s fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1 000 luksa), osam sati mraka. Izvješća ukazuju na to da vlažnost zraka ispod 60 % RV može spriječiti razmnožavanje.

Voda za razrjeđivanje

3. Može se upotrebljavati bilo koja prikladna prirodna ili sintetička voda. Obično se upotrebljavaju izvorska voda, voda iz slavine iz koje je uklonjen klor i umjetni mediji (npr. mediji Elendt „M4” ili „M7”; vidi u nastavku). Vodu je prije upotrebe potrebno dozračiti. Ako je to potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlijevanjem upotrijebljene vode iz posuda za uzgoj kulture, izravno ili putem sifona, da se pritom ne unište cjevčice s ličinkama.

Hranjenje ličinaka

4. Ličinke vrste *Chironomus* treba hraniti pahuljicama riblje hrane (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična robna marka riblje hrane), i to otprilike 250 mg dnevno po posudi. Hrana se može dati kao suhi usitnjeni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljaste hrane doda se u 20 ml vode za razrjeđivanje i izmiješa u homogenu smjesu. Taj se pripravak može dodavati brzinom od oko 5 ml dnevno po posudi (protresti prije upotrebe). Starije ličinke mogu dobiti više hrane.

5. Hranjenje se prilagođava kakvoći vode. Ako hranjiva podloga za uzgoj kultura postane „mutna”, potrebno je smanjiti hranjenje. Dodavanje hrane potrebno je pažljivo nadzirati. Premalo hrane dovest će do prebacivanja ličinaka prema vodenom stupcu, a previše hrane dovest će do povećane aktivnosti mikroba i sniženih koncentracija kisika. Oba ta uvjeta mogu dovesti do sniženih brzina rasta.

6. Mogu se dodati i stanice nekih zelenih algi (npr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kada se postavljaju nove posude za uzgoj kultura.

Hranjenje preobraženih odraslih životinja

7. Neki izvođači pokusa sugerirali su da bi vuneni podložak namočen u zasićenoj šećernoj otopini mogao poslužiti kao hrana za preobražene odrasle životinje.

▼M6

Preobrazba

8. Na 20 ± 2 °C ličinke iz posuda za uzgoj ličinaka počinju se preobražavati u odrasle životinje nakon otprilike 13 – 15 dana. Mužjaci se lako razaznaju po svojim dlakavim ticalima i tankom tijelu.

Mase jajašaca

9. Kad se u kavezu za uzgoj pojave odrasle životinje, u svim posudama za uzgoj ličinaka triput tjedno potrebno je provjeravati ima li položenih želatinoznih masa jajašaca. Ako ima masa jajašaca, potrebno ih je pažljivo ukloniti. Potrebno ih je prenijeti u malu posudu u kojoj se nalazi uzorak vode za uzgoj. Te se mase jajašaca upotrebljavaju za postavljanje nove posude za uzgoj kulture (npr. od dvoje do četiri mase jajašaca/posudi) ili se upotrebljavaju za ispitivanja toksičnosti.

10. Valjenje ličinaka u prvom stadiju razvoja trebalo bi se zbiti nakon dva do tri dana.

Postavljanje novih posuda za uzgoj kulture

11. Kad se kulture razviju, trebalo bi biti moguće postaviti novu posudu za uzgoj kulture jedanput tjedno ili rjeđe, ovisno o potrebama ispitivanja, i ukloniti starije posude nakon što se ličinke preobraze u odrasle mušice. Na taj način, uz minimalno upravljanje, stvarat će se redovita zaliha odraslih životinja.

Priprema ispitnih otopina „M4” i „M7”

12. Elendt (1990.) opisao je medij „M4”. Medij „M7” priprema se kao medij „M4”, osim za tvari iz tablice 1., za koje su koncentracije četiri puta niže u „M7” od onih u „M4”. Ispitnu otopinu ne bi trebalo pripremati prema Elendtu i Biasu (1990.) jer koncentracije $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 i K_2HPO_4 navedene za pripremu radnih otopina nisu adekvatne.

Priprema medija „M7”

13. Svaka se radna otopina (I) priprema zasebno, a kombinirana radna otopina (II) priprema se iz tih radnih otopina (I) (vidi tablicu 1.). Za pripremu medija „M7” miješa se 50 ml kombinirane radne otopine (II) i količine svake radne otopine makronutrijenata navedene u tablici 2. do ukupno jedne litre deionizirane vode. Vitaminska radna otopina priprema se dodavanjem triju vitamina u deioniziranu vodu, kao što je naznačeno u tablici 3., a 0,1 ml kombinirane vitaminske radne otopine dodaje se konačnom mediju „M7” netom prije upotrebe. Vitaminska radna otopina čuva se zamrznuta u malim alikvotima. Medij se dozrači i stabilizira.

Tablica 1.

Radne otopine elemenata u tragovima za medij M4 i M7

Radne otopine (I)	Količina (mg) od koje se umiješa do jedne litre deionizirane vode	Za pripremu kombinirane radne otopine (II): pomiješajte sljedeće količine (ml) radnih otopina (I) u do jedne litre deionizirane vode		Konačne koncentracije u ispitnim otopinama (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Radne otopine (I)	Količina (mg) od koje se umiješa do jedne litre deionizirane vode	Za pripremu kombinirane radne otopine (II): pomiješajte sljedeće količine (ml) radnih otopina (I) u do jedne litre deionizirane vode		Konačne koncentracije u ispitnim otopinama (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ([1])	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ ([1])	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ([1])	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ([1])	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ([1])	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ([1]) ([2])	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ([1]) ([2])	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

([1]) Ove se tvari razlikuju u M4 i M7, kao što je prethodno naznačeno.
([2]) Ove se otopine pripremaju odvojeno, a potom se sjedine i odmah obrade u autoklavu.

Tablica 2.

Radne otopine makronutrijenata za medij M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do jedne litre deionizirane vode (mg)	Količina radnih otopina makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tablica 3.

Vitaminska radna otopina za medij M4 i M7

Sve tri vitaminske otopine kombiniraju se u jednu vitaminsku radnu otopinu.

	Količina od koje se umiješa do jedne litre deionizirane vode (mg)	Količina vitaminske radne otopine koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim otopinama M4 i M7 (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

REFERENCE

BBA (1995.), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990.), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25. – 33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157. – 1167.

▼M6

Dodatak 3.

Priprema formuliranog sedimenta

SASTAV SEDIMENTA

Formulirani sediment trebao bi imati sljedeći sastav:

Sastojak	Svojstva	% suhe mase sedimenta
Treset	Sphagnum moss treset, što bliže pH-vrijednosti 5,5 – 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) i sušen na zraku	4 – 5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu 50 – 200 μm	75 – 76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljik	Prilagođava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, u prahu, kemijski čist	0,05 – 0,1
Voda	Provodljivost ≤ 10 μS/cm	30 – 50

PRIPREMA

Treset se suši na zraku i usitnjava u fini prah. Priprema se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u deioniziranoj vodi s pomoću uređaja za homogenizaciju visokog učinka. pH-vrijednost te suspenzije podešava se u području od 5,5 ± 0,5 s pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C, kako bi se stabilizirala pH-vrijednost i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH-vrijednost ponovno se mjeri i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskom glinom) i deioniziranom vodom kako bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u rasponu od 30–50 % suhe mase sedimenta. Još jednom mjeri se pH-vrijednost konačne smjese i podešava na od 6,5 do 7,5 s pomoću $CaCO_3$ ako je potrebno. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i sadržaj organskog ugljika. Potom se preporučuje da se formulirani sediment, prije upotrebe u ispitivanju toksičnosti trzalaca, priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u naknadnom ispitivanju.

SKLADIŠTENJE

Suhi sastojci za pripremu umjetnog sedimenta mogu se skladištiti na suhom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulirani (mokri) sediment ne bi trebalo skladištiti prije upotrebe u ispitivanju. Njega je potrebno upotrijebiti odmah nakon razdoblja pripremanja od sedam dana koje završava pripremu.

REFERENCE

OECD (1984.), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998.), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10. – 20.

▼**M6**

Dodatak 4.

Kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

SASTOJAK	KONCENTRACIJE
Čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

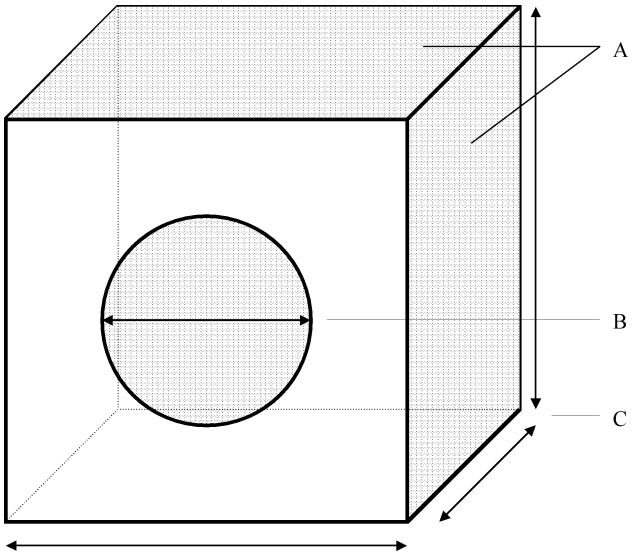
(*) Međutim, potrebno je imati na umu da, ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane kemikalije, potrebno je upotrebljavati vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije upotrebljavati medij Elendt M4).

▼**M6**

Dodatak 5.

Smjernice za provođenje ispitivanja

Primjer kaveza za uzgoj:



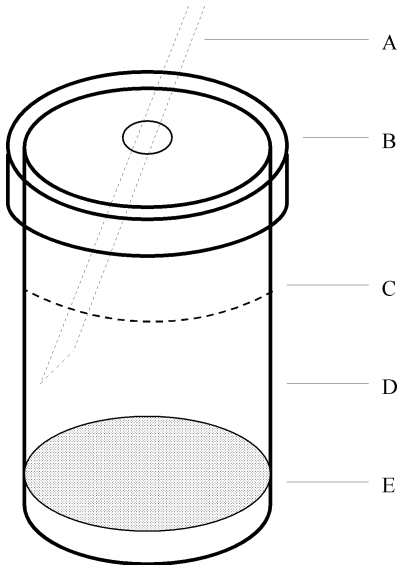
A: mreža na gornjoj strani i najmanje s jedne strane kaveza (veličina otvora gaze otprilike 1 mm)

B: otvor za stavljanje preobraženih odraslih životinja u kavez za uzgoj i uklanjanje položenih skupina jajašaca iz posuda za kristalizaciju (nije ovdje prikazano)

C: veličina kaveza za uzgoj najmanje duljine 30 cm, visine 30 cm i širine 30 cm

▼**M6**

Primjer ispitne posude:



A: Pasteurova pipeta za dovod zraka u vodu iznad sedimenta

B: stakleni poklopac za sprečavanje bijega preobraženih mušica

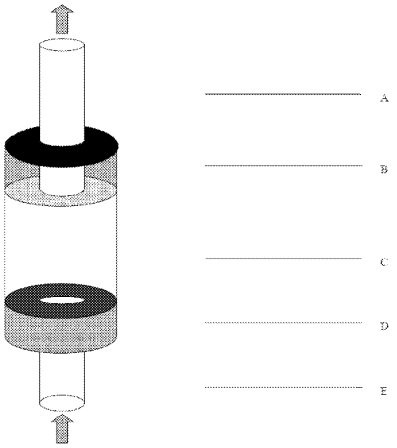
C: površinski sloj vode

D: ispitna posuda (staklena laboratorijska čaša od 600 ml)

E: sloj sedimenta

▼**M6**

Primjer sisaljke za hvatanje odraslih mušica (strelice ukazuju na smjer protoka zraka):



A: staklena cjevčica (unutarnji promjer otprilike 5 mm) spojena na samousisnu crpku

B: čep od vulkanizirane gume, probušen staklenom cjevčicom (A). S unutarnje strane otvor staklene cjevčice (A) prekriven je pamukom i gazom (veličina otvora mrežice otprilike 1 mm) kako bi se spriječila povreda mušica pri njihovu uvlačenju u sisaljku

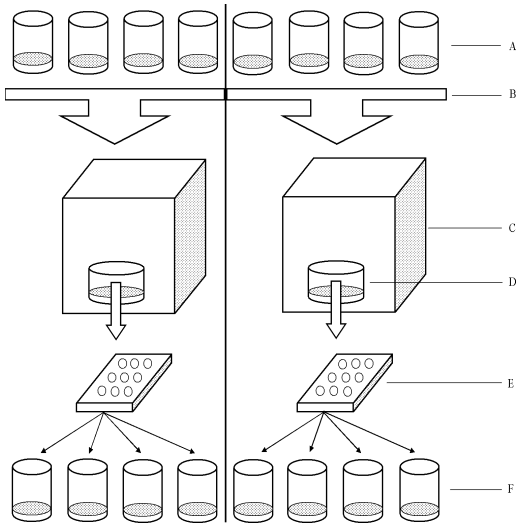
C: proziran spremnik (plastičan ili staklen, duljine otprilike 15 cm) za ulovljene mušice

D: čep od vulkanizirane gume, probušen cjevčicom (E). Za puštanje mušica u kavez za uzgoj, čep D se miče iz spremnika C

E: cjevčica (plastična ili staklena, unutarnjeg promjera otprilike 8 mm) za sakupljanje odraslih mušica iz posude

▼**M6**

Shematski prikaz ispitivanja životnog ciklusa:



A: prva generacija – ispitne posude koje sadržavaju sustav voda/sediment, osam ponavljanja, 20 ličinaka iz prvog stadija razvoja po posudi

B: četiri ispitne posude za svaki kavez za uzgoj, A i B

C: kavezi za uzgoj (A i B) za rojenje, parenje i polaganje jajašaca

D: posude za kristalizaciju za polaganje jajašaca

E: mikrotitracijske pločice, jedna jažica za svaku skupinu jajašaca

F: druga generacija – ispitne posude koje sadržavaju sustav voda/sediment, osam ponavljanja, 20 ličinaka iz prvog stadija razvoja po posudi.

▼M6

C.41. ISPITIVANJE SPOLNOG RAZVOJA RIBA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 234 (2011.). Temelji se na odluci iz 1998. o razvoju novih ili ažuriranju postojećih ispitnih metoda za preventivno ispitivanje i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača. Ispitivanje spolnog razvoja riba (FSDT) bilo je utvrđeno kao obećavajuća ispitna metoda kojom je bio obuhvaćen osjetljivi životni stadij riba u kojem dolazi do reakcije na kemikalije slične estrogenu i androgenu. Od 2006. do 2010. provedena je međulaboratorijska validacija ispitne metode u okviru koje su validirani medaka (*Oryzias latipes*), zebrica (*Danio rerio*) i koljuška (*Gasterosteus aculeatus*) i djelomično debeloglava gavčica (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Ovaj protokol uključuje medaku, koljušku i zebricu. Protokol je u načelu unapređenje Smjernice za ispitivanje OECD-a 210 Ispitivanje toksičnosti na ribama u ranim životnim stadijima (1), u kojem se izlaganje nastavlja sve do diferencijacije riba po spolu, odnosno približno 60 dana poslije valjenja (dph) za medaku, koljušku i zebricu (vrijeme izlaganja može biti kraće ili dulje za druge vrste koje će biti validirane u budućnosti), i dodavanja endokrinih konačnih učinaka. Ispitivanjem spolnog razvoja riba procjenjuju se učinci u ranim životnim stadijima i potencijalno štetne posljedice navodno endokrino disruptivnih kemikalija (npr. estrogena, androgena i inhibitora steroidogeneze) na spolni razvoj. Kombinacijom dvaju osnovnih endokrinih krajnjih učinaka, koncentracijom vitelogenina (VTG) i omjerom fenotipskih spolova omogućuje se da se u ispitivanju naznači način djelovanja ispitivane kemikalije. Zbog promjene omjera fenotipskih spolova koja je relevantna za populaciju, ispitivanje spolnog razvoja riba može se upotrebljavati za procjenu opasnosti i rizika. Međutim, ako se ispitivanje upotrebljava za procjenu opasnosti ili rizika, ne bi trebalo upotrebljavati koljušku jer raspoloživi podaci o validaciji do sada upućuju na to da za tu vrstu nisu uobičajene promjene omjera fenotipskih spolova pod djelovanjem ispitivanih kemikalija.

2. Protokol se temelji na ribama koje su putem vode izložene kemikalijama tijekom razdoblja u kojem je spol nestabilan i u kojem se očekuje da su ribe najosjetljivije na učinke endokrino disruptivnih kemikalija koje utječu na spolni razvoj. Dva osnovna krajnja učinka mjere se kao pokazatelji razvojnih aberacija povezanih s endokrinim sustavom, koncentracije VTG-a i omjeri spolova (udjeli spolova) utvrđeni histološkom analizom spolnih žlijezda. Histopatološka analiza spolnih žlijezda (ocjenjivanje i određivanje stadija jajnih stanica i spermatogenih stanica) nije obvezna. Pored toga, genetski spol određuje se kada god je to moguće (npr. u medake i koljuške). Prisutnost markera genetskog spola predstavlja znatnu prednost jer se njime povećava snaga statističkih podataka o omjeru spolova i omogućuje utvrđivanje pojedinačne promjene fenotipskog spola. Ostali apikalni krajnji učinci koje je potrebno mjeriti uključuju stopu valjenja, preživljavanje, dužinu i tjelesnu masu. Ispitna metoda mogla bi se prilagoditi za druge vrste koje nisu prethodno navedene pod uvjetom da druge vrste budu podvrgnute validaciji koja je jednaka onoj provedenoj za medaku, koljušku i zebricu, da se kontrolne ribe razlikuju po spolu na kraju ispitivanja, da su razine VTG-a dovoljno visoke za utvrđivanje znatnih varijacija povezanih s kemikalijama i da je utvrđena osjetljivost sustava ispitivanja primjenom endokrino aktivnih referentnih kemikalija ((anti)estrogena, (anti)androgena, inhibitora aromataze itd.). Pored toga, OECD bi trebao pregledati svako izvješće / sva izvješća o validaciji u kojem se upućuje na podatke o ispitivanju spolnog razvoja riba u kojem su upotrijebljene druge vrste, a ishod validacije trebao bi se smatrati zadovoljavajućim.

▼M6

Početna razmatranja i ograničenja

3. VTG se uobičajeno proizvodi u jetri ženki oviparnih kralježnjaka kao reakcija na cirkulirajući endogeni estrogen (2). On je prethodnik proteina u žumanjku koji nakon proizvodnje u jetri putuje krvotokom do jajnika, gdje ga preuzimaju i modificiraju jajašca u razvoju. Sinteza VTG-a vrlo je ograničena, iako ju je moguće utvrditi u nezrelih riba i odraslih mužjaka riba jer nemaju dovoljno cirkulirajućeg estrogena. Međutim, jetra može sintetizirati i izlučivati VTG kao reakciju na stimulaciju egzogenim estrogenom (3) (4) (5).

4. Mjerenjem VTG-a utvrđuju se kemikalije s estrogenim, antiestrogenim i androgenim načinima djelovanja i kemikalije koje utječu na steroidogenezu kao što su na primjer inhibitori aromataze. Postojanje estrogenih kemikalija može se utvrditi mjerenjem indukcije VTG-a u mužjacima riba, pri čemu je to utvrđivanje uvelike dokumentirano u znanstvenoj, stručno pregledanoj literaturi. Dokazana je i indukcija VTG-a nakon izlaganja androgenima koji mogu aromatizirati (6) (7). Smanjenjem razine cirkulirajućeg estrogena u ženkama, na primjer inhibicijom aromataze kojom se endogeni androgen pretvara u prirodni estrogen estradiol 17β, dolazi do smanjenja koncentracije VTG-a, koje služi za utvrđivanje kemikalija sa svojstvima inhibitora aromataze ili općenito inhibitora steroidogeneze (33). Biološka relevantnost reakcije VTG-a nakon estrogene inhibicije / inhibicije aromataze utvrđena je i uvelike dokumentirana (8) (9). Međutim, moguće je da na proizvodnju VTG-a u ženki utječu i opća toksičnost te neendokrini toksični načini djelovanja.

5. Uspješno je razvijeno i standardizirano nekoliko metoda mjerenja za rutinsku primjenu pri određivanju količine VTG-a u uzorcima krvi, jetre, cijelog tijela ili homogenata glave/repa prikupljenih od pojedinačnih riba. Navedeno vrijedi za zebricu, koljušku i medaku te za djelomično validiranu vrstu debeloglava gavčica; dostupne su metode enzimskog imunosorbentnog testa (ELISA) specifičnoga za vrstu u okviru kojih se primjenjuje imunokemija za kvantifikaciju VTG-a (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). U medake i zebrice postoji dobra korelacija između VTG-a izmjerenog iz uzoraka krvne plazme, jetre i homogenata, iako postoji tendencija da su vrijednosti dobivene iz homogenata nešto niže od onih dobivenih iz plazme (17) (18) (19). U Dodatku 5. predviđeni su preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu VTG-a.

6. Promjena omjera fenotipskih spolova (udjela spolova) krajnji je učinak kojim se odražava promjena spola. U načelu, estrogeni, antiestrogeni, androgeni, antiandrogeni i kemikalije kojima se inhibira steroidogeneza mogu utjecati na omjer spolova riba u razvoju (20). Pokazalo se da je navedena promjena spola djelomično reverzibilna u zebrica (21) nakon izlaganja kemikalijama sličnima estrogenu, dok je promjena spola nakon izlaganja kemikalijama sličnima androgenu trajna (30). Spol je definiran kao ženski, muški, međuspol (jajne stanice i spermatogene stanice u jednoj spolnoj žlijezdi) ili nediferencirani, a u riba određuje se histološkom pretragom spolnih žlijezda. Smjernica je navedena u Dodatku 7. i Smjernici OECD-a za dijagnozu histopatološke analize spolnih žlijezda riba povezane s endokrinim sustavom (22).

7. Genetski se spol ispituje genetskim markerima ako postoje za određenu vrstu ribe. U medake ženski gen XX ili muški gen XY mogu se odrediti lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ili se može analizirati gen iz DM-domene povezan s kromosomom Y (DMY) (DMY negativan ili pozitivan)

▼M6

kako je opisano u (23) (24). Za koljušku postoji ekvivalentna metoda PCR-a za određivanje genetskog spola opisana u Dodatku 10. Mogućnošću da se genetski spol pojedinačno poveže s fenotipskim spolom poboljšava se snaga ispitivanja i stoga je genetski spol potrebno određivati za vrste s dokumentiranim markerima genetskog spola.

8. Dvama osnovnim krajnjim učincima, VTG-om i omjerom spolova, može se u kombinaciji dokazati endokrini način djelovanja kemikalije (tablica 1.). Omjer je spolova biomarker relevantan za populaciju (25) (26), a za određene, dobro definirane načine djelovanja mogu se primjenjivati rezultati ispitivanja spolnog razvoja riba za procjenu opasnosti i rizika ako to regulatorna agencija smatra primjerenim. U ovom trenutku ti načini djelovanja uključuju estrogene, androgene i inhibitore steroidogeneze.

Tablica 1.

Reakcija endokrinih krajnjih učinaka na različite načine djelovanja kemikalija:

↑ = u porastu, ↓ = u padu, — = nije istraženo

Način djelovanja	VTG ♂	VTG ♀	Omjer spolova	Upućivanja
Slab agonist estrogena	↑	↑	↑♀ ili ↑nediferencirano	(27) (40)
Jak agonist estrogena	↑	↑	↑♀ ili ↑nediferencirano, bez ♂	(28) (40)
Antagonist estrogena	—	—	↓♀, ↑nediferencirano	(29)
Agonist androgena	↓ ili —	↓ ili —	↑ ♂, bez ♀	(28) (30)
Antagonist androgena	—	—	↑♀ ↑Međuspol	(31)
Inhibitor aromataze	↓	↓	↓♀	(33)

9. Ispitivanjem spolnog razvoja riba nije obuhvaćen reproduktivni životni stadij riba i stoga je kemikalije za koje se pretpostavlja da utječu na reprodukciju u nižim koncentracijama od onih za spolni razvoj potrebno proučiti u okviru ispitivanja kojim je obuhvaćena reprodukcija.

10. Definicije u smislu ove ispitne metode navedene su u Dodatku 1.

11. *In vivo* ispitivanje spolnog razvoja riba namijenjeno je utvrđivanju kemikalija s androgenim i estrogenim svojstvima kao i antiandrogenim i antiestrogenim svojstvima te svojstvima inhibicije steroidogeneze. Validacijskim fazama (prvom i drugom) ispitivanja spolnog razvoja riba bile su obuhvaćene estrogene i androgene kemikalije te kemikalije kojima se inhibira steroidogeneza. Učinci antagonista estrogena i androgena u ispitivanju spolnog razvoja riba navedeni su u tablici 1., ali ti su načini djelovanja u ovom trenutku slabije dokumentirani.

NAČELO ISPITIVANJA

12. U okviru ispitivanja ribe, u stadijima od svježe oplođenih jajašaca do završetka spolne diferencijacije, izlažu se najmanje trima koncentracijama ispitivane kemikalije otopljene u vodi. Uvjeti ispitivanja trebali bi obuhvaćati protočni postupak, osim ako to nije moguće zbog dostupnosti ili naravi (npr. ograničena topljivost) ispitivane kemikalije. Ispitivanje počinje stavljanjem svježe oplođenih jajašaca (prije cijepanja blastodiska) u ispitne posude. U

▼M6

stavku 27. opisano je punjenje posuda za svaku vrstu. Za validirane vrste riba, odnosno za medaku, koljušku i zebricu utvrđeno je ispitivanje u trajanju od 60 dph. Nakon završetka ispitivanja sve se ribe humano usmrćuju. Biološki uzorak (krvna plazma, jetra ili homogenat glave/repa) za analizu VTG-a prikuplja se od svake ribe, a preostali dio fiksira se za histološku procjenu spolnih žlijezda radi određivanja fenotipskog spola; po izboru se može provesti histopatološka analiza (npr. određivanje stadija spolnih žlijezda, stupanj međuspola). Biološki uzorak (analna ili leđna peraja) za određivanje genetskog spola uzima se za vrste koje imaju odgovarajuće markere (Dodaci 9. i 10.).

13. Pregled relevantnih uvjeta ispitivanja specifičnih za validirane vrste, a to su medaka, koljuška i zebrica, prikazan je u Dodatku 2.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

14. Trebali bi biti dostupni rezultati testa akutne toksičnosti ili drugog testa kratkotrajne toksičnosti (npr. ispitna metoda C.14. (34) i Smjernica OECD-a TG 210 (1)), po mogućnosti provedenih na vrstama odabranima za ovo ispitivanje. To znači da su topljivost u vodi i tlak pare ispitivane kemikalije poznati te da je raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju kemikalije u ispitnim posudama s poznatom i dokumentiranom točnošću i granicom detekcije.

15. Osim toga, korisno je imati ostale informacije o strukturnoj formuli, čistoći kemikalije, stabilnosti u vodi i na svjetlosti, pKa, P_{ow} i rezultatima ispitivanja na laku biorazgradivost (ispitna metoda C.4.) (35).

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja

16. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi, primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— tijekom čitavog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi biti najmanje 60 posto vrijednosti zasićenosti kisikom (ASV),

— razlike u temperaturi vode između ispitnih posuda ni u jednom trenutku tijekom izlaganja ne bi trebale biti veće od ± 1,5 °C; temperaturu vode potrebno je održavati unutar utvrđenoga temperaturnog područja za ispitnu vrstu u pitanju (Dodatak 2.),

— na raspolaganju bi trebala biti validacijska metoda za analizu kemikalije izlaganja s granicom detekcije nižom od najniže nazivne koncentracije i trebali bi biti prikupljeni dokazi o tome da su koncentracije ispitivane kemikalije u otopini na zadovoljavajući način održavane u granicama ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,

— ukupno preživljavanje oplođenih jajašaca u kontrolnim skupinama i po potrebi kontrolnim skupinama s otapalom trebalo bi biti veće od ili jednako graničnim vrijednostima definiranima u Dodatku 2.,

— kriteriji prihvatljivosti povezani s rastom i udjelima spolova na kraju ispitivanja temelje se na podacima iz kontrolnih skupina (kontrola otapala i vode zajedno, osim ako su bitno drukčiji, u tom slučaju samo kontrola otapala):

▼M6

		Medaka	Zebrica	Koljuška
Rast	Mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Dužina (standardna dužina)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Omjer spolova (% mužjaka ili ženki)		30 – 70 %	30 – 70 %	30 – 70 %

— Ako se upotrebljava otapalo, ono ne bi trebalo imati nikakvog statistički značajnog učinka na preživljavanje i ne bi trebalo izazivati nikakve endokrine disruptivne učinke ili druge štetne učinke na rane životne stadije, što se otkriva kontrolnom skupinom s otapalom.

Ako je opaženo odstupanje od kriterija prihvatljivosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost podataka o ispitivanju i ta razmatranja uključiti u izvješćivanje.

OPIS ISPITNE METODE

Ispitne posude

17. Mogu se upotrebljavati bilo kakve staklene posude, posude od plemenitog čelika ili druge kemijski inertne posude. Posude bi trebale biti dovoljno velike da se omogući usklađenost s kriterijima količine punjenja navedenima u nastavku. Poželjno je da se ispitne posude nasumično smjeste unutar ispitnog prostora. Nasumičnom bloknom rasporedu gdje su sve koncentracije prisutne u svim blokovima potrebno je dati prednost u odnosu na potpuno nasumični raspored. Ispitne posude treba zaštititi od neželjenog uznemiravanja.

Odabir vrste

18. Preporučene vrste riba navedene su u Dodatku 2. Postupci za uključivanje novih vrsta navedeni su u stavku 2.

Držanje roditeljskih riba

19. Pojedinosti o držanju roditeljskih riba pod zadovoljavajućim uvjetima mogu se pronaći u Smjernici OECD-a TG 210 (1). Roditeljske ribe potrebno je hraniti odgovarajućom hranom jedanput ili dvaput dnevno.

Rukovanje embrijima i ličinkama

20. Na početku izlaganja embriji i ličinke mogu se položiti u manje staklene posude ili posude od plemenitog čelika smještene unutar glavne posude opremljene mrežastim stranicama odnosno krajevima kojima se omogućuje protok ispitivane kemikalije kroz posudu. Neturbulentno strujanje kroz navedene male posude može se postići tako da se posude objese o polugu s pomoću koje se posuda njiše gore-dolje, ali tako da ispitni organizmi ostanu čitavo vrijeme uronjeni.

21. Ako se za držanje jajašaca unutar glavne ispitne posude upotrebljavaju spremnici za jajašca, rešetke ili mreže, njih je potrebno ukloniti nakon što se ličinke izvale, osim mreža, koje je potrebno zadržati kako bi se onemogućio bijeg riba. Ako ličinke treba premjestiti, ne bi ih trebalo izložiti zraku; ribe iz spremnika za jajašca ne bi trebalo vaditi mrežicom. Vrijeme prijenosa različito je ovisno o vrsti, s time da prijenos nije uvijek ni potreban.

▼M6

Voda

22. Prikladna je ispitna voda svaka voda u kojoj je kontrolna vrijednost preživljavanja ispitne vrste barem na razini jednakoj onoj u vodi opisanoj u Dodacima 2. i 3. Ona bi trebala biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (na primjer reagiranjem s ispitivanom kemikalijom) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Potrebno je mjeriti ukupni organski ugljik, provodljivost, pH-vrijednost i suspendirane krute tvari na primjer svaka tri mjeseca ako je poznato da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Teške metale (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavne anione i katione (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) i pesticide potrebno je mjeriti ako je kakvoća vode upitna. Pojedinosti o kemijskoj analizi i skupljanju vode navedene su u stavku 34.

Ispitne otopine

23. Ako je to izvedivo u praksi, potrebno je primjenjivati protočni sustav. Kod protočnih ispitivanja za dopremanje niza koncentracija u ispitne posude potreban je sustav koji stalno odmjerava i razrjeđuje radnu otopinu ispitivane kemikalije (npr. dozirna crpka, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač). Brzine protoka radnih otopina i vode za razrjeđivanje potrebno je provjeravati u određenim razmacima tijekom ispitivanja i one za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Pokazalo se da je prikladna brzina protoka koja odgovara barem peterostrukom volumenu ispitne posude u 24 sata (1). Potrebno je paziti da se ne upotrebljavaju plastične cijevi ili drugi materijali, od kojih neki mogu sadržavati biološki aktivne kemikalije ili mogu adsorbirati ispitivanu kemikaliju.

24. Radnu otopinu potrebno je po mogućnosti pripremiti bez primjene otapala jednostavnim miješanjem ili protresanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. mješačem ili ultrazvukom). Ako se ispitivana kemikalija teško otapa u vodi, potrebno je slijediti postupke opisane u Smjernici OECD-a za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (36). Potrebno je izbjegavati upotrebu otapala, ali ona će u nekim slučajevima možda biti potrebna kako bi se dobila prikladno koncentrirana radna otopina. Primjeri prikladnih otapala navedeni su u (36).

25. Potrebno je izbjegavati polustatične uvjete ispitivanja, osim ako su opravdani utemeljenim razlozima koji se odnose na ispitivanu kemikaliju (npr. stabilnost, ograničena dostupnost, visoki troškovi ili opasnost). Kod polustatičnog postupka mogu se primjenjivati dva različita postupka obnavljanja. Pripremaju se nove ispitne otopine u čistim posudama te se preživjela jajašca i ličinke nježno prenose u nove posude ili se ispitni organizmi zadržavaju u ispitnim posudama dok se dio ispitne vode (najmanje dvije trećine) mijenja svakog dana.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Prikupljanje jajašaca i trajanje

26. Kako bi se izbjeglo utjecanje na odabir genetskog materijala, jajašca se skupljaju od najmanje triju uzgojnih parova ili skupine, miješaju i nasumično odabiru prije početka ispitivanja. Za koljušku vidi opis umjetne oplodnje u Dodatku 11. Ispitivanje je potrebno početi što je prije moguće nakon

▼M6

oplodnje jajašaca, pri čemu je embrije potrebno po mogućnosti uroniti u ispitne otopine prije ili što je prije moguće nakon početka cijepanja blastodiska, a najkasnije 12 sati nakon oplodnje. Ispitivanje je potrebno nastaviti do završetka spolne diferencijacije u kontrolnoj skupni (60 dph za medaku, koljušku i zebricu).

Punjenje

27. Broj oplođenih jajašaca na početku ispitivanja trebao bi iznositi najmanje 120 po koncentraciji raspoređeno na najmanje četiri ponavljanja (za kontrolu je prihvaćena raspodjela po metodi drugog korijena). Jajašca je potrebno nasumično rasporediti (primjenom statističkih tablica za nasumičan odabir) između ispitnih posuda. Količina punjenja (definiciju vidi u Dodatku 1.) trebala bi biti dovoljno niska da se koncentracija otopljenog kisika može održati barem na razini 60 % ASV-a bez izravnog dozračivanja posuda. Preporučena količina punjenja kod protočnih ispitivanja iznosi najviše 0,5 g/l u 24 sata i najviše 5 g/l otopine u bilo kojem trenutku. Najkasnije 28 dana nakon oplodnje broj riba po ponavljanju potrebno je ponovno rasporediti tako da broj riba u svakom ponavljanju bude što je moguće sličniji. U slučaju pojavljivanja smrtnosti povezane s izlaganjem broj ponavljanja potrebno je na odgovarajući način smanjiti kako bi gustoća riba između razina obrade bila što je moguće sličnija.

Svjetlo i temperatura

28. Razdoblje svjetla i tame i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (vidi Dodatak 2. u vezi s uvjetima pokusa za ispitivanje spolnog razvoja riba).

Hranjenje

29. Hrana i hranjenje kritični su i bitno je za svaki stadij osigurati pravilnu hranu u odgovarajućim vremenskim razmacima i na razinama dostatnima za normalan rast. Hranjenje bi trebalo biti *ad libitum* vodeći računa o tome da višak bude minimalan. Kako bi se postigla dostatna stopa rasta, ribe je potrebno hraniti najmanje dva puta dnevno (vikendom je prihvatljivo jedanput dnevno) uz razmak od najmanje tri sata između svakog hranjenja. Suvišnu hranu i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nakupljanje otpada. Na temelju stečenog iskustva hrana i režimi hranjenja neprestano se unapređuju u cilju optimizacije rasta i poboljšanja preživljavanja. Stoga je potrebno nastojati od priznatih stručnjaka dobiti potvrdu za predloženi režim. Hranjenje je potrebno prekinuti 24 sata prije završetka ispitivanja. Primjeri odgovarajuće hrane navedeni su u Dodatku 2. (vidi i Okvir za ispitivanje riba OECD-a) (39).

Ispitne koncentracije

30. Ispitivane kemikalije potrebno je rasporediti kako je opisano u Dodatku 4. Potrebno je upotrijebiti minimalno tri ispitne koncentracije u najmanje četiri ponavljanja. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija potrebno je uzeti u obzir krivulju ovisnosti LC_{50} o vremenu izlaganja kod dostupnih istraživanja akutne toksičnosti. Ako se podaci upotrebljavaju za procjenu rizika, preporučuje se pet ispitnih koncentracija.

31. Nije potrebno ispitivati koncentracije kemikalije iznad 10 % LC_{50} kod akutne toksičnosti za odrasle ribe ili 10 mg/l, ovisno o tome što je manje. Maksimalna ispitna koncentracija trebala bi biti 10 % LC_{50} po životnom stadiju ličinke / juvenilne ribe.

▼M6

Kontrolne skupine

32. Uz ispitne koncentracije potrebno je provesti jednu kontrolnu skupinu s vodom za razrjeđivanje (≥ 4 ponavljanja) i po potrebi jednu kontrolnu skupinu s otapalom. U ispitivanju potrebno je upotrebljavati samo otapala za koja je ispitivanjem utvrđeno da nemaju statistički značajan utjecaj na krajnje učinke ispitivanja.

33. Ako se upotrebljava otapalo, njegova konačna koncentracija ne bi trebala biti veća od 0,1 ml/l (36) i koncentracija bi trebala biti jednaka u svim ispitnim posudama, osim u slučaju kontrole s vodom za razrjeđivanje. Međutim, potrebno je uložiti sve napore da se izbjegne upotreba takvih otapala ili bi koncentracije otapala trebale biti minimalne.

Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

34. Kemijsku je analizu koncentracije ispitivane kemikalije potrebno provesti prije početka ispitivanja kako bi se provjerila usklađenost s kriterijima prihvatljivosti. Sva ponavljanja potrebno je analizirati pojedinačno na početku i kraju ispitivanja. Jedno ponavljanje po ispitnoj koncentraciji potrebno je analizirati najmanje jedanput tjedno tijekom ispitivanja uz sustavnu izmjenu ponavljanja (1, 2, 3, 4, 1, 2….). Ako se uzorci pohranjuju za kasniju analizu, metoda pohrane uzoraka trebala bi biti prethodno validirana. Uzorke je potrebno filtrirati (npr. primjenom veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati kako bi se osigurala određivanja kemikalije u pravoj otopini.

35. Otopljeni kisik, pH-vrijednost, ukupnu tvrdoću, provodljivost, salinitet (po potrebi) i temperaturu potrebno je mjeriti u svim ispitnim posudama tijekom ispitivanja. Otopljeni kisik, salinitet (po potrebi) i temperaturu potrebno je mjeriti najmanje jedanput tjedno, a pH-vrijednost, provodljivost i tvrdoću na početku i na kraju ispitivanja. Temperaturu je po mogućnosti potrebno neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

36. Rezultati bi se trebali temeljiti na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako se koncentracija ispitivane kemikalije u otopini tijekom čitavog ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nazivne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nazivnim ili izmjerenim vrijednostima.

Opažanja i mjerenja

Stadij embrionalnog razvoja

37. Izlaganje bi trebalo započeti što je prije moguće nakon oplodnje i prije početka cijepanja blastodiska, a najkasnije 12 sati nakon oplodnje kako bi se osiguralo izlaganje tijekom ranog embrionalnog razvoja.

Valjenje i preživljavanje

38. Valjenje i preživljavanje potrebno je promatrati najmanje jedanput dnevno i relevantne brojke dokumentirati. Mrtve embrije, ličinke i juvenilne ribe potrebno je ukloniti čim ih se uoči jer se mogu brzo raspasti i druge ih ribe svojim aktivnostima mogu raskidati. Kod uklanjanja mrtvih jedinki nužan je krajnji oprez kako bi se izbjegli udarci ili fizičko ozljeđivanje susjednih jajašaca/ličinki, koji su izuzetno nježni i osjetljivi. Kriteriji za utvrđivanje smrti razlikuju se ovisno o životnom stadiju:

— za jajašca: posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom,

▼M6

— za ličinke i juvenilne ribe: nepomičnost i/ili odsutnost pokreta disanja i/ili odsutnost bila i/ili bijela mutna boja središnjeg živčanog sustava i/ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje.

Neuobičajeni izgled

39. Potrebno je zabilježiti broj ličinki ili riba u kojih su vidljive nepravilnosti u obliku tijela i opisati izgled i vrstu nepravilnosti. Važno je napomenuti da je pojava abnormalnih embrija i ličinki prirodna i da ih u nekih vrsta u kontroli/kontrolama može biti i više postotaka. Abnormalne životinje potrebno je ukloniti iz ispitnih posuda tek nakon smrti. Međutim, u skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, ako nepravilnosti prouzroče bol, patnju, stres ili trajno oštećenje i ako se smrt može pouzdano predvidjeti, životinje je potrebno anestezirati i usmrtiti kako je opisano u stavku 44. i obraditi kao smrtnost u analizi podataka.

Neuobičajeno ponašanje

40. Nepravilnosti, npr. hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, atipičnu mirnoću i atipično ponašanje pri hranjenju potrebno je bilježiti kada se pojave.

Masa

41. Na kraju ispitivanja potrebno je usmrtiti (anestezirati ako je potrebno uzeti uzorke krvi) sve preživjele ribe i izmjeriti pojedinačnu mokru masu riba (osušenih upijajućim materijalom).

Dužina

42. Na kraju ispitivanja potrebno je izmjeriti pojedinačne dužine (standardne dužine).

43. Na temelju navedenih opažanja dobit će se svi ili neki od sljedećih podataka koji se upotrebljavaju u izvješćivanju:

— kumulativna smrtnost,

— broj zdravih riba na kraju ispitivanja,

— vrijeme do početka valjenja i kraja valjenja,

— dužina i masa preživjelih životinja,

— broj deformiranih ličinki,

— broj riba koje pokazuju neuobičajeno ponašanje.

Uzorkovanje riba

44. Uzorkovanje riba provodi se nakon završetka ispitivanja. Uzorkovanu ribu potrebno je usmrtiti npr. primjenom MS-222 (100 – 500 mg po litri puferirano s 200 mg $NaHCO_3$ po litri) ili FA-100 (4-alil-2-metoksifenol: eugenol) i pojedinačno izmjeriti i izvagati kao mokru masu ribe (osušene upijajućim materijalom) ili anestezirati ako je potrebno uzeti uzorak krvi (vidi stavak 49.).

Uzorkovanje za analizu VTG-a i određivanje spola histološkom procjenom

45. Sve ribe potrebno je uzorkovati i pripremiti za analizu spola i VTG-a. Sve ribe potrebno je histološki analizirati kako bi im seodredio spol. Za mjerenje

▼M6

VTG-a prihvaća se poduzorkovanje najmanje 16 riba iz svakog ponavljanja. Potrebno je analizirati više riba za VTG ako se rezultati poduzorkovanja pokažu nejasnima.

46. Postupak uzorkovanja za VTG i određivanje spola ovise o metodi analize VTG-a.

Metoda homogenata glave/repa za analizu VTG-a

47. Ribe se usmrćuju. Glava i rep svake ribe skalpelom se odvajaju od tijela ribe rezovima neposredno iza prsnih peraja i neposredno iza leđne peraje (vidi sliku 1.). Glava i rep svake ribe ujedinjuju se, važu i pojedinačno označuju brojem, zamrzavaju tekućim dušikom i pohranjuju na – 70 ° ili manje za analizu VTG-a. Tijelo ribe označuje se brojem i fiksira u odgovarajućem fiksativu za histološku procjenu (22). Primjenom ove metode VTG i histopatološka analiza ocjenjuju se za svaku jedinku i stoga se svaka promjena razine VTG-a može povezati s fenotipskim spolom ribe ili genetskim spolom (medaka i koljuška) ribe. Za više informacija vidi smjernicu za homogenizaciju (Dodatak 5.) i smjernicu za kvantifikaciju VTG-a (Dodatak 6.).

Metoda homogenata jetre za analizu VTG-a

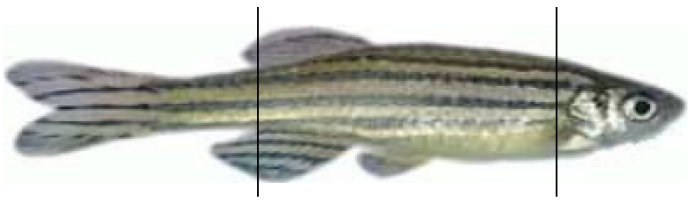
48. Ribe se usmrćuju. Jetra se secira i pohranjuje na ili ispod – 70 °C. Preporučeni su postupci za eksciziju i prethodnu obradu jetre navedeni u Smjernici OECD-a TG 229 (37.) ili poglavlju C.37. ovog Priloga (38). Potom se jetra pojedinačno homogenizira kako je opisano u Smjernici OECD-a TG 229 ili poglavlju C.37. ovog Priloga. Prikupljeni supernatant upotrebljava se za mjerenje VTG-a homolognom ELISA tehnikom (vidi Dodatak 6. za primjer kvantifikacije u slučaju zebrica ili Smjernicu OECD-a TG 229 (37) za medaku). Primjenom tog pristupa moguće je dobiti i podatke o VTG-u i histološkoj analizi spolnih žlijezda za pojedinačne ribe.

Metoda krvne plazme za analizu VTG-a

49. Krv se prikuplja iz riba pod anestezijom punkcijom srca, iz kaudalne vene ili rezanjem repa i centrifugira na 4 °C za prikupljanje plazme. Plazma se pohranjuje na ili ispod – 70 °C. Sve se ribe usmrćuju i fiksiraju za histološku analizu. Uzorci plazme i ribe pojedinačno se označuju brojevima kako bi se razine VTG-a povezale sa spolom riba.

Slika 1.

Kako rezati ribu za mjerenje VTG-a u homogenatu glave/repa i histološkoj procjeni srednjeg dijela.



▼M6

Određivanje genetskog spola

50. Biološki uzorak za određivanje genetskog spola uzima se iz pojedinačnih riba u vrsta koje imaju odgovarajuće markere. U slučaju medake uzima se analna ili leđna peraja. U Dodatku 9. naveden je detaljan opis uključujući uzorkovanje tkiva i određivanje spola metodom PCR-a. Isto tako, u Dodatku 10. opisano je uzorkovanje tkiva i određivanje spola metodom PCR-a za koljušku.

Mjerenje VTG-a

51. Mjerenje VTG-a trebalo bi se temeljiti na kvantitativnoj i analitički provjerenoj metodi. Informacije bi trebale biti dostupne na temelju varijabilnosti metode upotrijebljene u odgovarajućem laboratoriju unutar testa i između testova. Izvor međulaboratorijske i unutarlaboratorijske varijabilnosti (najvjerojatnije) temelji se na različitim razvojnim stadijima populacije riba. Uzimajući u obzir varijabilnost mjerenja VTG-a, najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) koje se temelje samo na tom krajnjem učinku potrebno je obraditi s velikom pažnjom. Dostupne su različite metode za procjenu proizvodnje VTG-a u ribljim vrstama koje se razmatraju u ovom ispitivanju. Mjerna je tehnika koja je relativno osjetljiva i specifična određivanje koncentracija proteina enzimskim imunosorbentnim testom (ELISA). Trebala bi se upotrebljavati homologna antitijela (na VTG iste vrste) i najvažniji homologni standardi.

Određivanje spola

52. Ovisno o postupku uzorkovanja VTG-a, cijela se riba ili preostali srednji dio svake ribe stavlja u prethodno označenu kasetu za obradu i fiksira u odgovarajućem fiksativu za histološko određivanje spola (po izboru i za procjenu stadija razvoja spolnih žlijezda). Smjernica za fiksiranje i uklapanje navedena je u Dodatku 7. i Smjernici OECD-a za dijagnozu histopatološke analize spolnih žlijezda riba povezane s endokrinim sustavom (22). Nakon obrade ribe se uklapaju u parafinske blokove. Jedinke se polažu longitudinalno u parafinski blok. Od svake se jedinke uzima najmanje šest longitudinalnih sekcija (debljine 3 – 5 μm) u prednjoj ravnini uključujući tkivo obiju spolnih žlijezda. Razmak između navedenih sekcija trebao bi biti oko 50 μm za mužjake i 250 μm za ženke. Međutim, s obzirom na to da će svaki blok često sadržavati mužjake i ženke (ako je u svaki blok uklopljeno više jedinki), razmak između sekcija iz navedenih blokova trebao bi biti oko 50 μm dok se ne dobije najmanje šest sekcija spolnih žlijezda od svakog mužjaka. Nakon toga razmak između sekcija može se povećati na oko 250 μm za ženke. Sekcije se boje hematoksilinom i eozinom i ispituju svjetlosnom mikroskopijom s fokusom na spol (muški, ženski, međuspol, nediferenciran). Međuspol je definiran kao prisutnost više od jedne jajne stanice u testisu u šest analiziranih sekcija ili spermatogenih stanica (da/ne) u jajnicima. Histopatološka analiza i određivanje stadija jajnika i testisa nisu obvezni, ali ako se ispituju, rezultate je potrebno statistički analizirati i navesti u izvješću. Potrebno je navesti da određene riblje vrste prirodno nemaju potpuno razvijeni par spolnih žlijezda i da može biti prisutna samo jedna spolna žlijezda (to je npr. slučaj u medake i povremeno u zebrice). Sva takva opažanja potrebno je zabilježiti.

53. Određivanje genetskog spola u pojedinačnih medaki temelji se na prisutnosti ili odsutnosti gena kojim se određuje muški spol medake, DMY, a smješten je na kromosomu Y. Genotipski spol medake može se odrediti sekvenciranjem gena DMY iz DNK-a ekstrahiranog iz, na primjer, komada analne

▼M6

peraje ili prsne peraje. Prisutnost gena DMY ukazuje na jedinku XY (mužjaka) bez obzira na fenotip, dok njegova odsutnost ukazuje na jedinku XX (ženku) bez obzira na fenotip (23). Smjernica za pripremu tkiva i metodu PCR-a navedena je u Dodatku 9. U pojedinačnih se koljuški spol isto tako određuje metodom PCR-a kako je opisano u Dodatku 10.

54. Pojavu međuspola (definiciju vidi u Dodatku 1.) potrebno je navesti u izvješću.

Sekundarna spolna obilježja

55. U vrsta kao što je medaka sekundarna spolna obilježja pod kontrolom su endokrinog sustava; stoga je opažanja povezana s fizičkim izgledom riba potrebno po mogućnosti provesti nakon završetka izlaganja. U ženki medake papilarna formacija na stražnjem dijelu analne peraje osjetljiva je na androgen. U poglavlju C.37. ovog Priloga (38) nalaze se relevantne fotografije sekundarnih spolnih obilježja mužjaka i androgeniziranih ženki.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

56. Važno je da se krajnji učinak odredi najjačim valjanim statističkim ispitivanjem. Ponavljanje je pokusna jedinica, ali u statističko ispitivanje potrebno je uključiti i varijabilnost unutar ponavljanja. Dodatak 8. sadržava dijagram toka odlučivanja kao pomoć pri odabiru najprikladnijeg statističkog ispitivanja na temelju svojstava podataka dobivenih ispitivanjem. Razina statističke značajnosti iznosi 0,05 za sve uključene krajnje učinke.

Udjeli spolova i genetski spol

57. Udjele spolova trebalo bi analizirati u pogledu značajnog učinka (pristup NOEC/LOEC (najniža koncentracija s vidljivim učinkom)) izlaganja Jonckheere-Terpstrovim testom (testom trendova) ako postoji monotonična reakcija na dozu. Ako se utvrdi nepostojanje monotoničnosti, potrebno je primijeniti test parova. Dunnettov test upotrebljava se ako se mogu postići normalnost i homogena varijanca. Tamhane-Dunnettov test upotrebljava se ako je prisutna heterogena varijanca. U protivnom, upotrebljava se Mann-Whitneyev test s prilagodbom Bonferroni-Holm. Dijagram toka kojim su opisani statistički podaci o udjelima spolova prikazan je u Dodatku 8. Udjele spolova potrebno je u tablicama prikazati kao udjele koncentracija ± standardno odstupanje ženki, mužjaka, međuspolova i nediferenciranih. Potrebno je istaknuti statističku značajnost. Primjeri su prikazani u izvješću o validaciji druge faze ispitivanja spolnog razvoja riba (42). Genetski spol potrebno je navesti kao postotak promjene fenotipskog spola mužjaka, ženki, međuspolova i nediferenciranih.

Koncentracije VTG-a

58. Koncentracije VTG-a potrebno je analizirati s obzirom na značajan učinak (pristup NOEC/LOEC) izlaganja. Prednost se daje Dunnettovom testu u odnosu na t-test s Bonferronijevom korekcijom. Ako se upotrebljava Bonferronijeva korekcija, prednost se daje Bonferroni-Holmovoj korekciji. Potrebno je predvidjeti logaritamsku transformaciju VTG-a za postizanje normalnosti i homogenosti varijance. Nadalje, ako je reakcija na koncentraciju u skladu s monotoničnošću, prednost se daje Jonckheere-Terpstrovu testu u odnosu na sve prethodno navedene. Ako se upotrebljavaju t-testovi ili Dunnettov test, nema potrebe za značajnim F-testom analize varijance

▼M6

(ANOVA) kako bi se nastavilo dalje. Pojedinosti su prikazane u dijagramu toka u Dodatku 8. Rezultati u tablicama navode se kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardno odstupanje posebno za mužjake, ženke, međuspol i nediferencirane. Potrebno je istaknuti statističku značajnost za fenotipske ženke i fenotipske mužjake. Primjeri su prikazani u izvješću o validaciji druge faze ispitivanja spolnog razvoja riba (42).

Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije

59. Stvarne koncentracije ispitivane kemikalije u posudama potrebno je analizirati učestalošću opisanom u stavku 34. Rezultati u tablicama navode se kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardno odstupanje na temelju ponavljanja te na temelju koncentracije, pri čemu se ističu informacije o broju uzoraka i netipične vrijednosti iz srednje koncentracije obrade ± 20 %. Primjeri se mogu pronaći u izvješću o validaciji druge faze ispitivanja spolnog razvoja riba (42).

Tumačenje rezultata

60. Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim otopinama nalaze u blizini granice detekcije analitičke metode.

Izvješće o ispitivanju

61. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće podatke:

ispitivanu kemikaliju

— relevantna fizikalno-kemijska svojstva, podatke za identifikaciju kemikalije, uključujući podatke o čistoći i analitičkoj metodi za kvantifikaciju ispitivane kemikalije,

uvjete ispitivanja

— primijenjeni postupak ispitivanja (npr. protočni polustatični / obnavljanje), plan ispitivanja uključujući ispitne koncentracije, način pripreme radnih otopina (u Prilogu), učestalost obnavljanja (ako se primjenjuju, potrebno je navesti otapajuće sredstvo i njegovu koncentraciju),

— nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihova standardna odstupanja u ispitnim posudama i metodu kojom su dobivene (upotrijebljena analitička metoda trebala bi biti prikazana u Prilogu), dokaze da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u pravoj otopini,

— kakvoću vode u ispitnim posudama: pH-vrijednost, tvrdoću, temperaturu i koncentraciju otopljenog kisika,

— detaljne informacije o hranjenju (npr. vrstu (vrste) hrane, izvor, količinu dane hrane i učestalost hranjenja te po potrebi analize provedene radi utvrđivanja kontaminirajućih tvari (npr. polikloriranih bifenila (PCB), policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) i organofosfornih pesticida),

rezultate

— dokaze o usklađenosti kontrola s validacijskim kriterijima: podatke o stopi valjenja u tablicama potrebno je navesti kao postotak po ponavljanju i po koncentraciji. Potrebno je istaknuti netipične vrijednosti u odnosu na kriterije prihvatljivosti (u kontrolama). Preživljavanje je potrebno prikazati kao postotak po ponavljanju i po koncentraciji. Potrebno je istaknuti netipične vrijednosti u odnosu na validacijske kriterije (u kontrolama),

— jasno navođenje rezultata dobivenih u vezi s različitim opaženim krajnjim učincima: preživljavanje embrija i uspješnost valjenja, vanjske nepravilnosti, dužinu i masu, mjerenja VTG-a (ng/g homogenata,

▼M6

ng/ml plazme ili ng/mg jetre), histološku analizu spolnih žlijezda, omjer spolova, podatke o genetičkom spolu, učestalost svih neuobičajenih reakcija u riba i sve vidljive učinke nastale kao posljedica ispitivane kemikalije.

62. Rezultate je potrebno prikazati kao srednje vrijednosti ± standardno odstupanje ili standardna pogreška. Statistički podaci navode se najmanje kao NOEC i LOEC te intervali pouzdanosti. Potrebno je slijediti statistički dijagram toka (Dodatak 8.).

LITERATURA

(1) OECD (1992.), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen i J. P. Sumpter, 1996., „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, str. 194. – 202.

(3) Sumpter, J. P., i S. Jobling, 1995., „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, str. 173. – 178.

(4) Tyler, C. R., R. van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix i H. Trip (1999.), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry 18, str. 337. – 347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen i P. Bjerregaard (2001.a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, str. 119. – 131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard i B. Korsgaard (2003.), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, str. 319. – 321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T. H. Madsen, L. Norrgren i G. I. Petersen (2003.), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, str. 397. – 411.

(8) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, R. Lange, C. M. Lye, J. P. Sumpter, M. Zerulla i C. R. Tyler (2002.), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, str. 319. – 326.

(9) Sun, L. W., J. M. Zha, P. A. Spear i Z. J. Wang (2007.), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, str. 533. – 541.

(10) Parks, L. G., A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc i C. V.Sullivan (1999.), „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, str. 113. – 125.

(11) Brion, F., B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr i J. M. Porcher (2002.), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)", Environmental Toxicology and Chemistry 21, str. 1699. – 1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara i E. Tamiya (2002.), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, str. 161. – 169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James i B. E. Bengtsson (2004.), „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, str. 311. – 326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita i T. Iguchi (2004.), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, str. 301. – 308.

(15) Eidem, J. K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson i A. Goksoyr (2006.), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, str. 202. – 206.

(16) Jensen, K. M., i G. T. Ankley (2006.), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, str. 101. – 105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., i Bjerregaard, P., (2001.b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, str. 48. – 51.

(18) Nilsen, B. M., K. Berg, J. K. Eidem, S. I. Kristiansen, F. Brion, J. M. Porcher i A. Goksoyr (2004.), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, str. 621. – 633.

(19) Orn, S., S. Yamani i L. Norrgren (2006.), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone"., Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, str. 237. – 243.

(20) Scholz, S., i N. Kluver (2009.), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish", Sexual Development 3, str. 136. – 151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers i H. Segner (2005.), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, str. 1088. – 1098.

(22) OECD (2010.), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Pariz.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata i Y. Nagahama (2004.), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, str. 518. – 526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi i M. Sakaizumi (2004.), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, str. 613. – 619.

(25) Kidd, K. A., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak i R. W. Flick (2007.), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, str. 8897. – 8901.

(26) Palace, V. P., R. E. Evans, K. G. Wautier, K. H. Mills, P. J. Blanchfield, B. J. Park, C. L. Baron i K. A. Kidd (2009.), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, str. 1920. – 1935.

(27) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, J. Bamforth, R. D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno i C. R. Tyler (2006.), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Aquatic Toxicology 77, str. 279. – 290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., L. Andersen, G. I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren i P. Bjerregaard (2006.), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, str. 57. – 66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard i P. Bjerregaard (2004.), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)", Fish Physiology and Biochemistry 30, str. 257. – 266.

(30) Morthorst, J. E., H. Holbech i P. Bjerregaard (2010.), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, str. 336. – 343.

(31) Kiparissis, Y., T. L. Metcalfe, G. C. Balch i C. D. Metcalf (2003.), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)", Aquatic Toxicology 63, str. 391. – 403.

(32) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, A. Sherren, R. D. Stanley i C. R. Tyler (2004.), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development", Aquatic Toxicology 70, str. 11. – 21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G. I. Petersen i P. Bjerregaard (2007.), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, str. 165. – 170.

(34) Poglavlje C.14. ovog Priloga, Test rasta juvenilnih riba.

(35) Poglavlje C.4. ovog Priloga, Određivanje „lake" biorazgradivosti.

(36) OECD (2000.), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Pariz.

(37) OECD (2009.), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

(38) Poglavlje C.37. ovog Priloga, 21-dnevni test na ribama: Kratkoročni test probira na estrogensku i androgensku aktivnost i inhibiciju aromataze.

(39) OECD (2012.), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Pariz.

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H., (2007.), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio", Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10, str. 768. – 779.

(41) OECD (2011.), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Pariz.

(42) OECD (2011.), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Pariz.

(43) OECD (2011.), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Pariz.

(44) Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. SL L 276, 20.10.2010., str. 33.

▼M6

Dodatak 1.

Pokrate i definicije

Apikalni krajnji učinak: izaziva učinak na razini populacije.

ASV: vrijednost zasićenosti kisikom.

Biomarker: izaziva učinak na razini jedinke.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Dph: dana poslije valjenja.

DMY: gen iz DM-domene specifičan za kromosom Y i potreban za razvoj mužjaka medake.

ELISA: enzimski imunosorbentni test.

Masa ribe: mokra masa ribe (osušene upijajućim materijalom).

FSDT: ispitivanje spolnog razvoja riba.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

Međuspolna riba: riba s više od jedne jajne stanice u testisu u šest analiziranih sekcija ili sa spermatogenim stanicama u jajnicima (da/ne).

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa riba u odnosu na određenu količinu vode.

MOA: način djelovanja.

RT-PCR: lančana reakcija polimeraze u reverznoj transkriptazi.

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

Nediferencirana riba: riba sa spolnim žlijezdama bez raspoznatljivih zametnih stanica.

VTG: vitelogenin.

▼M6

Dodatak 2.

Uvjeti pokusa za ispitivanje spolnog razvoja riba (slatkovodne vrste)

1. Preporučene vrste	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrica (*Danio rerio*)	Koljuška (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Vrsta ispitivanja	Protočno ili polustatično	Protočno ili polustatično	Protočno ili polustatično
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kakvoća osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar)	Fluorescentne žarulje (široki spektar)	Fluorescentne žarulje (široki spektar)
5. Jakost svjetla	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)
6. Razdoblje svjetla i tame	12 – 16 h svjetlo, 8 – 12 h tama	12 – 16 h svjetlo, 8 – 12 h tama	16 h svjetlo, 8 h tama
7. Minimalna veličina posude	Pojedinačne posude trebale bi sadržavati minimalno 7 l volumena vode	Pojedinačne posude trebale bi sadržavati minimalno 7 l volumena vode	Pojedinačne posude trebale bi sadržavati minimalno 7 l volumena vode
8. Zamjene volumena ispitnih otopina	Minimalno pet dnevno	Minimalno pet dnevno	Minimalno pet dnevno
9. Starost ispitnih organizama na početku izlaganja	Svježe oplođena jajašca (stadij rane blastule)	Svježe oplođena jajašca (stadij rane blastule)	Svježe oplođena jajašca
10. Broj jajašaca po obradi	Minimalno 120	Minimalno 120	Minimalno 120
11. Broj obrada	Minimalno tri (plus prikladne kontrole)	Minimalno tri (plus prikladne kontrole)	Minimalno tri (plus prikladne kontrole)
12. Broj ponavljanja po obradi	Minimalno četiri (osim raspodjele po metodi drugog korijena za kontrole)	Minimalno četiri (osim raspodjele po metodi drugog korijena za kontrole)	Minimalno četiri (osim raspodjele po metodi drugog korijena za kontrole)
13. Režim hranjenja	Živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.	Posebna suha hrana, živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.	Živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.
14. Dozračivanje	Bez dozračivanja, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne na manje od 60 % zasićenosti	Bez dozračivanja, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne na manje od 60 % zasićenosti	Bez dozračivanja, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne na manje od 70 % zasićenosti

▼**M6**

15. Voda za razrjeđivanje	Čista površina, izvorska ili obrađena voda	Čista površina, izvorska ili obrađena voda	Čista površina, izvorska ili obrađena voda
16. Trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biološki krajnji učinci	Uspješnost valjenja, preživljavanje, makromorfologija, VTG, histološka analiza spolnih žlijezda, genetski spol, omjer spolova	Uspješnost valjenja, preživljavanje, makromorfologija, VTG, histološka analiza spolnih žlijezda, omjer spolova	Uspješnost valjenja, preživljavanje, makromorfologija, VTG, histološka analiza spolnih žlijezda, omjer spolova
18. Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja za udružena ponavljanja kontrola	Uspješnost valjenja > 80 %	Uspješnost valjenja > 80 %	Uspješnost valjenja > 80 %
	Preživljavanje nakon valjenja ≥ 70 %	Preživljavanje nakon valjenja ≥ 70 %	Preživljavanje nakon valjenja ≥ 70 %
	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 150 mg	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 75 mg	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 120 mg
	Dužina (standardna dužina) > 20 mm	Dužina (standardna dužina) > 14 mm	Dužina (standardna dužina) > 20 mm
	Omjer spolova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %	Omjer spolova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %	Omjer spolova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %

▼**M6**

Dodatak 3.

Kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

SASTOJAK	KONCENTRACIJA
Čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
Neionizirani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µug/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatak 4.

Iz ispitne metode c.14. / smjernica za ispitne koncentracije

Stupac (broj koncentracija između 100 i 10 ili između 10 i 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Iz stupca može se odabrati niz od triju uzastopnih koncentracija (ili više njih). U stupcu (2× + 1) navedene su središnje točke između koncentracija iz stupca (×). Navedene vrijednosti koncentracija mogu predstavljati volumne ili masene postotke (mg/l ili µg/l). Vrijednosti se po potrebi mogu množiti ili dijeliti bilo kojom potencijom broja 10. Stupac 1. može se primjenjivati ako postoji velika nesigurnost u pogledu razine toksičnosti.

▼M6

Dodatak 5.

Smjernica za homogenizaciju glave i repa juvenilne zebrice, debeloglave gavčice, koljuške i medake

Cilj je ovog odjeljka opisati postupke koji prethode kvantifikaciji koncentracije VTG-a. Mogu se primjenjivati i drugi postupci čiji su rezultati usporedivi s kvantifikacijom VTG-a. Određivanje koncentracije VTG-a u krvnoj plazmi ili jetri umjesto u homogenatu glave/repa nije obvezno.

Postupak

1. Ribe se anesteziraju i usmrćuju u skladu s opisom ispitivanja.

2. Glava i rep ribe režu se u skladu s opisom ispitivanja. **Važno**: sve instrumente za seciranje i ploču za rezanje potrebno je pravilno isprati i očistiti (npr. 96 %-tnim etanolom) između postupanja sa svakom pojedinačnom ribom kako bi se spriječilo „onečišćenje VTG-a" sa ženki ili induciranih mužjaka na neinducirane mužjake.

3. Zajednička masa glave i repa svake ribe mjeri se s točnošću do miligrama.

4. Nakon vaganja dijelovi se stavljaju u odgovarajuće cijevi (npr. u Eppendorfovu epruvetu od 1,5 ml) i zamrzavaju na – 80 °C do homogenizacije ili se izravno homogeniziraju na ledu s dvama plastičnim tučcima. (Mogu se primjenjivati i druge metode ako se provode na ledu i ako je rezultat homogena masa.) **Važno**: *cijevi bi trebale biti pravilno označene brojevima tako da se glava i rep ribe mogu povezati s odgovarajućom sekcijom tijela upotrijebljenom za histološku analizu spolnih žlijezda.*

5. Nakon dobivanja homogene mase dodaje se ledeno hladni **homogenizacijski pufer** (*) u količini koja odgovara 4 – 10 puta masi tkiva (razrjeđivanje se bilježi). Nastavlja se rad s tučcima dok smjesa ne postane homogena. **Važna napomena:** *za svaku se ribu upotrebljavaju novi tučci.*

6. Uzorci se stavljaju na led do centrifugiranja na **4 °C** i na 50 000 g tijekom 30 minuta.

7. Pipetom se odmjeravaju količine od 20 do 50 µl (količina se bilježi) supernatanta u **najmanje dvije** cijevi umakanjem vrha pipete ispod sloja masti na površini i pažljivim usisavanjem supernatanta bez dijelova masti ili peleta.

8. Cijevi se do upotrebe pohranjuju na – 80 °C.

(*) *Pufer za homogenizaciju:*

50 mM Tris-HCl pH-vrijednost 7,4; 1 % koktela inhibitora proteaze (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH-vrijednost 7,4 + 120 µl koktela inhibitora proteaze (ili istovjetnih koktela inhibitora proteaze).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktel inhibitora proteaze: iz proizvoda Sigma (za tkivo sisavaca) broj **P 8340.**

Napomena: homogenizacijski pufer potrebno je upotrijebiti na dan njegove izrade. Tijekom primjene stavlja se na led.

▼M6

Dodatak 6.

Smjernica za kvantifikaciju vitelogenina iz homogenata glave i repa zebrice (*Danio rerio*) (izmijenjena u odnosu na Holbech *et al.*, 2001.). Mogu se primjenjivati drugi postupci u kojima se primjenjuju homologna antitijela i drugi standardi

1. Mikrotitracijske pločice (certificirani Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danska), na koje se prethodno nanosi 5 µg/ml antitijela na lipovitelin-IgG zebrice, otapaju se i ispiru tri puta puferom za ispiranje (*).

2. Standard pročišćenog vitelogenina zebrice ([1]) serijski se razrjeđuje na 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 i 20 ng/ml u puferu za razrjeđivanje (**) te se uzorci razrjeđuju najmanje 200 puta (kako bi se spriječio učinak matrice) u puferu za razrjeđivanje i nanose na pločice. Kontrola testa provodi se dva puta. U svaku se jažicu stavlja 150 µl. Standardi se primjenjuju dva puta, a uzorci tri puta. Inkubira se tijekom noći na 4 °C na mućkalici.

3. Pločice se ispiru pet puta puferom za ispiranje (*).

4. Peroksidaza hrena (HRP) povezana s dekstranskim lancem (npr. AMDEX A/S, Danska) i konjugirana antitijela razrjeđuju se u puferu za ispiranje; stvarno se razrjeđivanje razlikuje po šarži i starosti. U svaku jažicu stavlja se 150 µl i pločice se inkubiraju sat vremena na sobnoj temperaturi na mućkalici.

5. Pločice se ispiru pet puta puferom za ispiranje (*) i dno pločica pažljivo se čisti etanolom.

6. U svaku jažicu stavlja se 150 µl tetrametil benzidina (TMB) plus (***). Pločica se zaštićuje od svjetla aluminijskom folijom i prati se razvoj boje u mućkalici.

7. Nakon što je potpuno razvijena standardna krivulja, zaustavlja se djelovanje enzima dodavanjem 150 µl 0,2 M H_2SO_4 u svaku jažicu.

8. Apsorbancija se mjeri na 450 nm (npr. na čitaču pločica Molecular Devices Thermomax). Podaci se analiziraju povezanim softverom (npr. Softmaxom).

(*) Pufer za ispiranje:

PBS – izvorna otopina (****)	500,0	ml
goveđi serumski albumin (BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

podešavanje pH-vrijednosti na 7,3 i dodavanje millipore H_2O do 5 l. Pohranjivanje na 4 °C.

(**) Pufer za razrjeđivanje:

PBS – izvorna otopina (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

podešavanje pH-vrijednosti na 7,3 i dodavanje millipore H_2O do 1 l. Pohranjivanje na 4 °C.

(***) TMB plus jest supstrat spreman za upotrebu koji proizvodi KemEnTec (Danska). Osjetljiv je na svjetlo. Pohranjivanje na 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), pročišćeno u skladu s: Denslow, N. D., Chow, M.C., Kroll, K. J., Green, L. (1999.). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385. – 398.

▼**M6**

(****) PBS – izvorna otopina

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

podešavanje pH-vrijednosti na 6,8 i dodavanje millipore H_2O do 2 l. Pohranjivanje na sobnoj temperaturi.

▼M6

Dodatak 7.

Smjernica za pripremu sekcija tkiva za određivanje spola i određivanje stadija spolnih žlijezda

Cilj je ovog odjeljka opisati postupke koji prethode histološkoj procjeni sekcija. Mogu se primjenjivati i drugi postupci čiji je rezultat slično određivanje spola i određivanje stadija spolnih žlijezda.

Uz nekoliko iznimaka, navedeni su postupci slični za medaku i zebricu.

Usmrćivanje, obdukcija i fiksiranje tkiva

Ciljevi:

1. osigurati humano usmrćivanje riba;

2. dobiti potrebne tjelesne mase i mjerenja;

3. ocijeniti sekundarna spolna obilježja;

4. secirati tkiva za analizu VTG-a;

5. fiksirati spolne žlijezde.

Postupci:

1. Ribe je potrebno usmrtiti neposredno prije obdukcije. Stoga, osim ako je na raspolaganju više osoba koje obavljaju seciranje, više riba ne bi trebalo usmrćivati istovremeno.

2. Riba se mrežicom uklanja iz pokusne posude i u prijenosnom spremniku prenosi u područje za obdukciju.

3. Riba se stavlja u otopinu za usmrćivanje. Riba se uklanja iz otopine nakon prestanka disanja i nakon prestanka reagiranja na vanjske podražaje.

4. Određuje se mokra masa ribe.

5. Za pripremu tkiva za analizu VTG-a riba se može staviti na ploču od prešanog pluta na stolu mikroskopa za seciranje.

   a. Zebrici se glava reže neposredno iza prsne peraje, a rep se reže neposredno iza leđne peraje.

   b. Medaki se otvara abdomen pažljivim rezom uz središnju trbušnu liniju od prsnog pojasa do točke kranijalno od anusa. Jetra se pažljivo uklanja malim hvataljkama i malim škarama.

6. Uzorci za analizu VTG-a stavljaju se u Eppendorfove epruvete i odmah zamrzavaju tekućim dušikom.

7. Trupla se sa spolnom žlijezdama stavljaju u prethodno označenu plastičnu kasetu za tkivo koja se prenosi na Davidsonov ili Bouinov fiksativ. Volumen fiksativa trebao bi biti najmanje deset puta približni volumen tkiva. Spremnik fiksativa nježno se protresa pet sekundi kako bi se uklonili mjehurići zraka iz kasete.

8. a. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu tijekom noći nakon čega se sljedećeg dana premještaju u pojedinačne spremnike s 10 %-tnim neutralnim puferiranim formalinom. Spremnici s kasetama nježno se protresaju pet sekundi kako bi se osiguralo odgovarajuće prodiranje formalina u kasete;

▼M6

b. Tkiva ostaju u Bouinovu fiksativu 24 sata nakon čega se premještaju u 70 %-tni etanol.

Obrada tkiva

Ciljevi:

1. Dehidrirati tkivo radi odgovarajućeg prodiranja parafina.

2. Impregnirati tkivo parafinom radi zadržavanja integriteta tkiva i stvaranja čvrste površine za mikrotomiju.

Postupci:

3. Označene kasete s tkivima uklanjanju se iz formalina/etanola i stavljaju u košaru (košare) za obradu. Košara za obradu stavlja se u uređaj za obradu tkiva.

4. Odabire se program obrade.

5. Nakon što uređaj za obradu tkiva završi ciklus obrade, košaru/košare može se prenijeti u jedinicu za uklapanje.

Uklapanje

Cilj:

Pravilno usmjeriti uzorak u očvrsnutom parafinu za mikrotomiju.

Postupci:

1. Košara (košare) kaseta uklanja (uklanjaju) se iz uređaja za obradu i uranja (uranjaju) u prednju, parafinom ispunjenu posudu termalne konzole uklopne jedinice ili se kasete prenose u odvojeni parafinski grijač.

2. Prva kaseta koju treba uklopiti uklanja se iz prednje posude termalne konzole ili parafinskog grijača. Poklopac kasete uklanja se i baca, a oznaka kasete uspoređuje se s evidencijom o životinjama kako bi se prije uklapanja riješila potencijalna odstupanja.

3. Odabire se kalup za uklapanje odgovarajuće veličine.

4. Kalup se drži ispod otvora konzole za doziranje i puni otopljenim parafinom.

5. Uzorak se uklanja iz kasete i stavlja u otopljeni parafin u kalupu. Postupak se ponavlja s četiri do osam uzoraka za svaki kalup s parafinom. Položaj pojedinačnih riba označava se stavljanjem ribe broj 1 pod kutom od 180 stupnjeva u odnosu na ribu broj 2 – 4/8.

6. Dodatnim se parafinom prekriva uzorak.

7. Kalup s postoljem kasete stavlja se na rashladnu ploču kriokonzole.

8. Nakon stvrdnjavanja parafina blok (odnosno stvrdnuti parafin koji sadržava tkiva i postolje kasete) se uklanja iz kalupa.

Mikrotomija

Cilj:

Izrezati i postaviti histološke sekcije za bojenje.

Postupci:

1. Početna faza mikrotomije nazvana „orijentacija” provodi se kako slijedi:

   a. Parafinski blok stavlja se na držač mikrotoma.

   b. Držač se pomiče prema naprijed okretanjem kotača mikrotoma i režu se deblje sekcije s parafinske površine bloka dok nož ne dođe do uklopljenih tkiva.

▼M6

c. Debljina sekcije na mikrotomu postavljena je između tri i pet mikrona. Držač se pomiče prema naprijed i reže se više sekcija s bloka kako bi se uklonili svi artefakti nastali na izrezanoj površini tkiva tijekom grubog obrezivanja.

d. Blok se može ukloniti s držača i položiti licem prema dolje na led radi namakanja tkiva.

2. Sljedeća faza mikrotomije jest završno rezanje i postavljanje sekcija tkiva na objektna stakalca. Ti se postupci provode kako slijedi:

a. Ako je blok stavljen na led, on se uklanja s leda i postavlja na držač mikrotoma.

b. Debljina sekcija na mikrotomu postavlja se na tri do pet mikrona i držač se pomiče prema naprijed okretanjem kotača mikrotoma. Sekcije se izrezuju iz bloka sve dok ne nastane „traka” koja sadržava najmanje jednu prihvatljivu sekciju uključujući i spolne žlijezde. (Tijekom rezanja blok se po potrebi može ukloniti iz držača, staviti na led radi namakanja tkiva i zatim ponovno postaviti na držač.)

c. Sekcije plutaju na površini vode u vodenoj kupelji. Treba pokušati dobiti najmanje jednu sekciju bez nabora i bez zarobljenih mjehurića zraka.

d. Mikroskopsko stakalce uranja se ispod najbolje sekcije, koja se vadi iz vode s pomoću stakalca. Taj se proces naziva postavljanje sekcije na objektno stakalce.

e. Pripremaju se po tri sekcije za skup riba. Druga i treća sekcija vade se u razmacima od 50 mikrona nakon prve sekcije. Ako ribe nisu uklopljene sa svojim spolnim žlijezdama na istoj razini rezanja, treba napraviti više sekcija kako bi se osiguralo da se od svake ribe dobije najmanje šest sekcija sa spolnim žlijezdama.

f. Na objektnom se stakalcu olovkom za označivanje objektnih stakalaca bilježi broj bloka iz kojeg je pripremljen preparat.

g. Objektno stakalce postavlja se na okvir za bojenje.

h. Blok se uklanja s držača i postavlja licem prema dolje za pohranu.

Bojenje, postavljanje pokrovnica i označivanje objektnih stakalaca

Ciljevi:

— Obojiti sekcije za histopatološki pregled.

— Trajno zabrtviti postavljena i obojena tkiva.

— Trajno odrediti obojene sekcije tako da se omogući potpuna sljedivost.

Postupci:

1. Bojenje

a. Objektna se stakalca prije bojenja suše na zraku tijekom noći.

b. Sekcije se boje hematoksilin-eozinom.

2. Postavljanje pokrovnica

a. Pokrovnice se postavljaju ručno ili automatski.

b. Objektno stakalce umače se u ksilen ili TissueClear, višak ksilena/TissueCleara nježno se otrese s objektnog stakalca.

▼**M6**

c. Oko 0,1 ml sredstva za pripremu preparata nanosi se blizu kraja objektnog stakalca nasuprot zamrznutom kraju ili na pokrovnicu.

d. Pokrovnica se naginje pod blagim kutom pri postavljanju na objektno stakalce.

3. Označivanje

a. Svaka oznaka na objektnom stakalcu trebala bi sadržavati sljedeće informacije:

i. naziv laboratorija;

ii. vrstu;

iii. broj uzorka / broj objektnog stakalca;

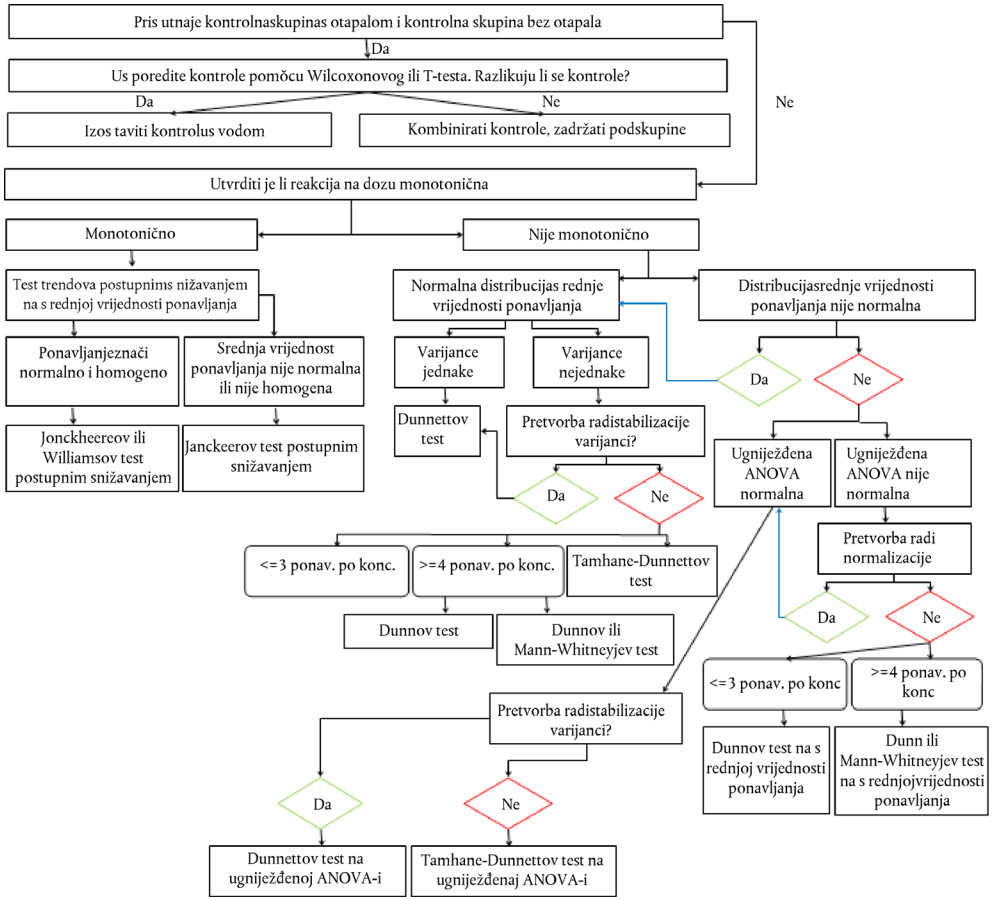
iv. kemikaliju / skupinu obrade;

v. datum.

▼M6

Dodatak 8.

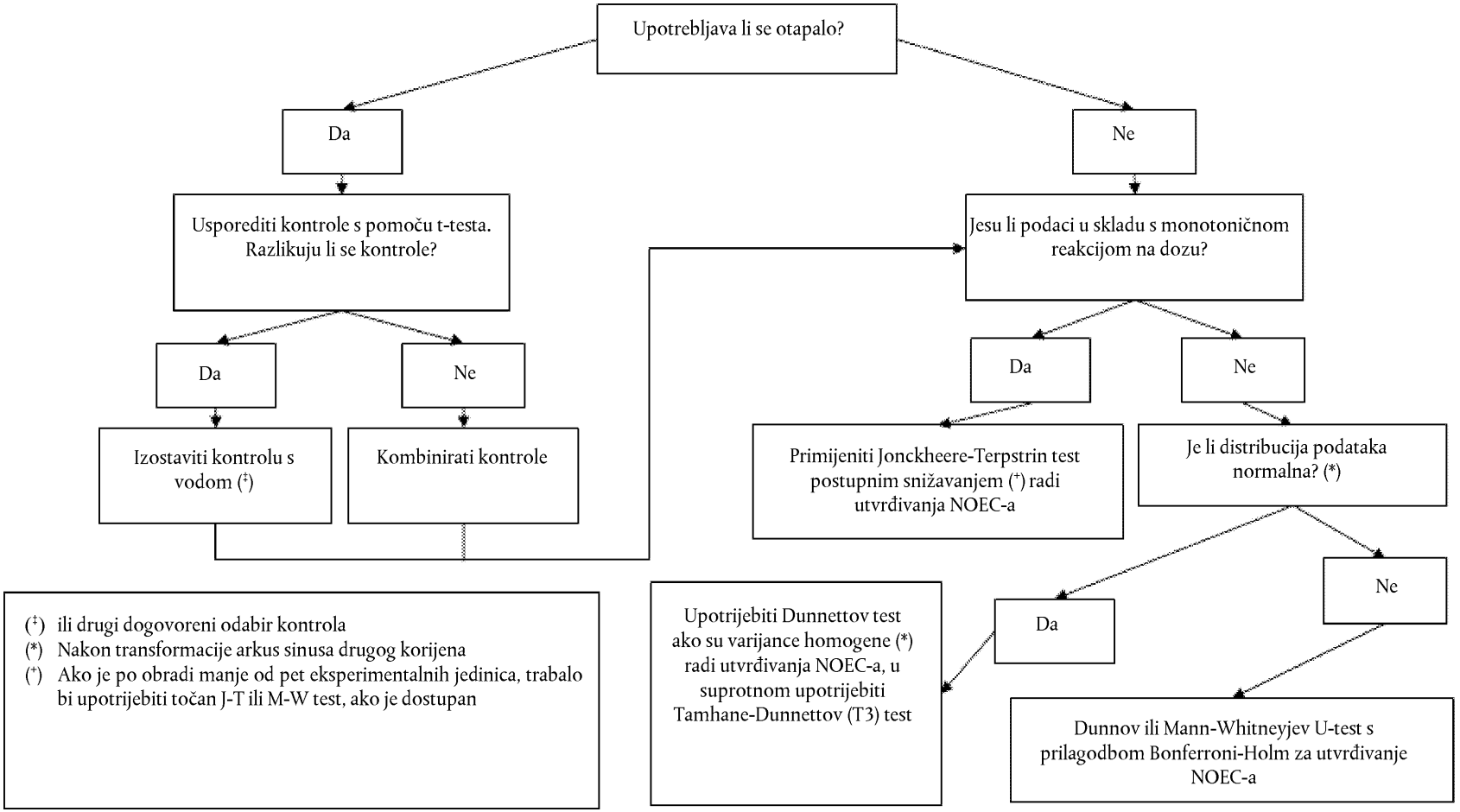
Statistički dijagram toka za analizu vitelogenina



02008R0440 — HR — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Statistički dijagram toka za analizu omjera spolova



▼M6

Dodatak 9.

Smjernica za uzorkovanje tkiva za određivanje genetskog spola i za određivanje genetskog spola metodom PCR-a

Uzorkovanje, priprema i pohrana tkiva prije određivanja genetskog spola metodom PCR-a u medake (pripremio Laboratorij za vodene organizme Bayer CropScience AG-a)

1. Finim se škarama reže analna ili leđna peraja svake pojedine ribe i stavlja u cijev napunjenu sa 100 µl pufera za ekstrakciju 1 (pojedinosti o pripremi pufera nalaze se u nastavku). Škare se nakon svake pojedine ribe čiste u laboratorijskoj čaši napunjenoj destiliranim H_2O i suše papirnatim ručnikom.

2. Nakon toga tkivo peraja homogenizira se teflonskim tučkom s mikrocjevčicom kako bi se razložile stanice. Za svaku se cijev upotrebljava novi tučak kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija. Tučci se tijekom noći stavljaju u 0,5 M NaOH, ispiru pet minuta u destiliranom H_2O i pohranjuju u etanolu ili sterilni nakon autoklava do upotrebe.

3. Tkivo peraja može se pohraniti i bez pufera za ekstrakciju 1 na suhom ledu i zatim na – 80 °C u hladnjaku kako bi se spriječila bilo kakva degeneracija DNK-a. Međutim, ekstrakciju je bolje provesti uz istovremenu ekstrakciju DNK-a (prethodno vidi postupak; uzorci bi se trebali otapati na ledu nakon pohrane na – 80 °C prije dodavanja pufera u cijevi).

4. Nakon homogenizacije sve se cijevi stavljaju u vodenu kupelj i kuhaju 15 minuta na 100 °C.

5. Zatim se pipetom u svaku cijev dodaje 100 µl pufera za ekstrakciju 2 (pojedinosti o pripremi pufera nalaze se u nastavku). Uzorci se pohranjuju na sobnoj temperaturi 15 minuta uz povremeno nježno protresanje rukom.

6. Nakon toga sve se cijevi ponovno stavljaju u vodenu kupelj i kuhaju dodatnih 15 minuta na 100 °C.

7. Do daljnje se analize cijevi zamrzavaju na – 20 °C.

Priprema pufera

PCR-pufer 1:

500 mg N-lauroilsarkozina (npr. Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)

2 ml 5M NaCl

dodaje se 100 ml destiliranog H_2O

→ autoklav

PCR-pufer 2:

20 g Chelexa (npr. Biorad, München, Njemačka)

bubrenje u 100 ml destiliranog H_2O

→ autoklav

Određivanje genetskog spola (metodom PCR-a) u medake (pripremili Laboratorij za vodene organizme Bayer CropScience AG-a i Universität Würzburg Biozentrum)

Pripremljene i zamrznute cijevi (opisane u prethodnom odjeljku) otapaju se na ledu. Nakon toga centrifugiraju se primjenom centrifuge za Eppendorfove epruvetice (30 sekundi pri maksimalnoj brzini na sobnoj temperaturi). Za PCR upotrebljava se bistri supernatant odvojen od taloga. Apsolutno se mora izbjeći prijenos bilo kakvih tragova Chelexa (lokaliziranog u talogu) na reakciju PCR jer će to utjecati na djelovanje polimeraze Taq. Supernatant se upotrebljava izravno ili se može pohraniti zamrznut (na – 20 °C) i ponovno otopiti u nekoliko ciklusa bez negativnog učinka na DNK za kasnije analize.

▼**M6**

1. *Priprema „reakcijske smjese” (25 µl po uzorku):*

	Volumen	Konačna koncentracija
Kalup DNK-a	0,5 µl – 2 µl	
10 x PCR-pufer s $MgCl_2$	2,5 µl	1 x
Nukleotidi (svaki dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Uzvodna početnica (10 µM) (vidi u nastavku 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
Nizvodna početnica (10 µM) (vidi u nastavku 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (stupanj čistoće za PCR)	do 25 µl	
Polimeraza Taq E	0,3 µl	1,5 U
10 × PCR-pufer s $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH-vrijednost 8,8 na 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 Tween 20		

Za svaki je PCR (vidi u nastavku 3 – 5) potrebna posebna početnica kao nova kombinacija „reakcijske smjese” i odgovarajuće potrebne količine kalupa DNK-a za svaki uzorak (vidi prethodno). Odgovarajući se volumeni pipetama prenose u nove cijevi. Nakon toga sve se cijevi zatvaraju, miješaju (oko deset sekundi) i centrifugiraju (deset sekundi na sobnoj temperaturi). Sada se može pokrenuti odgovarajući program PCR-a. Pored toga, u svakom se programu PCR-a primjenjuju pozitivna kontrola (reprezentativni uzorak DNK-a s poznatim djelovanjem i jasnim rezultatima) i negativna kontrola (1 µl destiliranog H_2O).

2. *Priprema agaroznog gela (1 %) – tijekom provedbe programa PCR-a:*

— Otopiti 3 g agaroze u 300 ml 1 × tris-acetatni EDTA pufera (TAE) (1 %-tni agarozni gel).

— Otopinu je potrebno kuhati u mikrovalnoj peći (oko dvije do tri minute).

— Topla se otopina prenosi u posebnu kutiju za izradu odljevaka, koja je položena na led.

— Nakon približno 20 minuta agarozni gel spreman je za upotrebu.

— Agarozni gel pohranjuje se u pufer TAE do kraja programa PCR-a.

3. *Program PCR-a za aktin*

Cilj je navedene reakcije PCR dokazati da DNK iz uzorka nije oštećen.

— Posebna početnica:

„Mact1(gornji/uzvodni)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(donji/nizvodni)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

pet minuta na 95 °C

ciklus (35 puta)

denaturacija → 45 sekundi na 95 °C

prianjanje → 45 sekundi na 56 °C

produljenje → jedna minuta na 68 °C

15 minuta na 68 °C

▼**M6**

4. *Program PCR-a za gene X i Y*

U okviru navedenog programa PCR-a upotrebljavaju se uzorci s netaknutim DNK-om za određivanje gena X i Y. Muški DNK trebao bi pokazivati jednu dvostruku vrpcu, a ženski jednu jednostruku vrpcu (nakon bojenja i gel-elektroforeze). U provedbu ovog programa potrebno je uključiti jednu pozitivnu kontrolu za mužjake (uzorak XY) i jednu za ženke (uzorak XX).

— Posebna početnica:

„PG 17,5” (gornji/uzvodni) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (donji/nizvodni) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

pet minuta na 95 °C

ciklus (40 puta)

denaturacija	→ 45 sekundi na 95 °C
prianjanje	→ 45 sekundi na 55 °C
produljenje	→ jedna minuta 30 sekundi na 68 °C

15 minuta na 68 °C

5. *Program PCR-a za gen Y kao „kontrola” programa PCR-a za gene X i Y*

Ovim se programom PCR-a potvrđuju rezultati „programa PCR-a za gene X i Y”. „Muški uzorci” trebali bi pokazivati jednu vrpcu, dok „ženski uzorci” ne bi trebali pokazivati ni jednu vrpcu (nakon bojenja i gel-elektroforeze).

— Posebna početnica:

„.DMTYa (gornji/uzvodni)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (donji/nizvodni)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

pet minuta na 95 °C

ciklus (40 puta)

denaturacija	→ 45 sekundi na 95 °C
prianjanje	→ 45 sekundi na 56 °C
produljenje	→ jedna minuta na 68 °C

15 minuta na 68 °C

6. *Bojenje uzoraka za PCR:*

otopina za bojenje:

50 % glicerola

100 mM EDTA-e

1 % natrijeva dodecil sulfata (SDS)

0,25 % bromfenol plavog

0,25 % ksilencijanola

U svaku se pojedinačnu cijev pipetom stavlja 1 µl otopine za bojenje.

7. *Početak gel-elektroforeze:*

— Pripremljeni 1 %-tni agarozni gel prenosi se u posudu za gel-elektroforezu koja je napunjena 1 × puferom TAE.

— Pipetom se prenosi 10 – 15 µl svakog obojenog uzorka za PCR u utor u agaroznom gelu.

— U zasebni se utor pipetom dodaje i 5 – 15 µl „ljestvice” od 1 kb (Invitrogen).

— Početak elektroforeze na 200 V.

— Prestanak nakon 30 – 45 minuta.

▼**M6**

8. *Određivanje vrpci:*

— Agarozni gel čisti se u destiliranom H_2O.

— Zatim se agarozni gel prenosi u etidijev bromid u trajanju 15 – 30 minuta.

— Nakon toga potrebno je napraviti sliku agaroznog gela UV lampom.

— Naposljetku se analiziraju uzorci u odnosu na vrpcu (ili vrpce) iz pozitivne kontrole i ljestvicu.

▼M6

Dodatak 10.

Smjernica za uzorkovanje tkiva za određivanje genetskog spola metodom PCR-a u koljuške

Uzorkovanje tkiva i ekstrakcija DNK-a

DNK se može ekstrahirati primjenom različitih komercijalno dostupnih reagensa te ručnih i automatskih sustava za ekstrakciju. U nastavku je opisan protokol koji se upotrebljava u laboratoriju Cefas Weymouth i po potrebi dodani su alternativni pristupi.

1. Sa svake se pojedinačne ribe finim škarama uklanja mali komad tkiva (10 – 20 mg) s dorzolateralnog područja (nakon uklanjanja glave i repa za analizu VTG-a). Tkivo se dodaje u cijev i zatim stavlja izravno u tekući dušik (za pohranu na – 80 °C) ili se cijev puni 70 %-tnim etanolom (za prijevoz i naknadnu pohranu na 4 °C). Nakon svake pojedinačne ribe škare se čiste u 70 %-tnom etanolu i zatim u destiliranoj vodi te suše papirnatim ručnikom.

2. Etanol se (ako je prisutan) uklanja aspiracijom i tkivo se tijekom noći otapa proteinazom K u 400 µl pufera za razlaganje životinjskog tkiva (ATL) (Qiagen). Alikvot (200 µl) otopine prenosi se u S-blok s 96 jažica (Qiagen) i ekstrahira se DNK u formatu s 96 jažica primjenom pribora Qiagen Universal BioRobot i QIamp Investigator BioRobot. DNK se eluira u 50 µl vode bez DNase i RNase. Ako se za ekstrakciju DNK-a upotrebljavaju čvrsta tkiva (kao što su bodlje ili prsne peraje), može biti potrebno homogenizirati uzorak u puferu za razlaganje uz primjenu instrumenta za razlaganje tkiva FastPrep® ili istovjetnog sustava za razlaganje tkiva.

   Kao druga mogućnost,

   (a) tkivo se otapa tijekom noći proteinazom K u 400 µl pufera za razlaganje G2 (Qiagen) i ekstrahira se DNK iz 200 µl otopine uz primjenu pribora za jednostavno dobivanje DNK-a iz tkiva EZ-1 i pribora EZ-1 biorobot ili minipribora za jednostavno dobivanje DNK-a iz tkiva. DNK se eluira u 50 µl volumena;

   (b) tkiva se obrađuju primjenom reagensa DNAzol. Ukratko, uzorci tkiva razlažu se u 1 ml DNAzola deset minuta u mikrocijevi za centrifugu od 1,5 ml i zatim centrifugiraju na 13 000 o/min pet minuta kako bi se uklonile sve čestice. Razloženi uzorak zatim se prenosi u novu mikrocijev za centrifugu od 1,5 ml koja sadržava 500 µl etanola 100 %-tne molekularne čistoće i potom centrifugira na 13 000 o/min deset minuta kako bi nastao talog DNK-a. Etanol se uklanja i zamjenjuje s 400 µl etanola 70 %-tne molekularne čistoće, provodi se centrifugiranje na 13 000 rpm pet minuta i otapa se pelet DNK-a u 50 µl vode bez DNase i RNase za molekularnu biologiju. Ponovno, ako se upotrebljavaju čvrsta tkiva (prsna peraja), može biti potrebno homogenizirati uzorak u puferu za razlaganje primjenom instrumenta za razlaganje tkiva FastPrep® ili istovjetnog sustava za razlaganje tkiva prije ekstrakcije DNK-a.

3. DNK se pohranjuje na – 20 °C do upotrebe.

Važna napomena: obvezno je nošenje rukavica tijekom postupaka.

Analiza lančane reakcije polimerazom (PCR)

Provedene su amplifikacije primjenom 2,5 µl ekstrakta DNK-a u 50 µl reakcijskog volumena uz upotrebu prajmera lokusa Idh (kako je opisano u Peichel *et al*., 2004. Current Biology 1:1416. – 1424.):

uzvodna početnica	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
nizvodna početnica	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

Mnogo je dobavljača odgovarajućih reagensa za PCR. Metoda opisana u nastavku trenutačno se primjenjuje u laboratoriju Cefas Weymouth.

1. *Priprema „reakcijske smjese" (50 µl po uzorku)*

Glavna smjesa priprema se kako slijedi. Smjesu je moguće pripremiti unaprijed i pohraniti zamrznutu na – 20 °C do upotrebe. Treba pripremiti dovoljno glavne smjese za negativnu kontrolu (samo voda za molekularnu biologiju).

	Volumen (koncentracija zaliha) / uzorak	Konačna koncentracija
5 x reakcijski pufer GoTaq®	10 µl	1 x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM svaki)	250 µM svaki
Uzvodna početnica	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Nizvodna početnica	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda za molekularnu biologiju	30,75 µl	
Polimeraza GoTaq	0,25 µl	1,25 U

— Ulijeva se 47,5 µl u označenu cijev za PCR tanke stijenke od 0,5 ml.

— Dodaje se 2,5 µl pročišćenog DNK-a u prikladno označenu cijev. Postupak se ponavlja za sve uzorke i negativnu kontrolu.

— Na vrh se nanose dvije kapi mineralnog ulja. Kao druga mogućnost može se upotrijebiti cirkularna termalna kupka sa zagrijanim poklopcem.

— Zatvaraju se poklopci.

— Uzorci su bili denaturirani u cirkularnoj termalnoj kupki Peltier PTC-225 na 94 ± 2 °C pet minuta nakon čega je slijedilo 39 ciklusa na 94 ± 2 °C jednu minutu, na 55 ± 2 °C jednu minutu, na 72 ± 2 °C jednu minutu i konačno produljenje na 72 ± 2 °C deset minuta.

2. *Priprema agaroznog gela (2 %)*

Tradicionalno se produkti PCR-a razlučuju na 20 % agaroznom gelu koji sadržava etidijev bromid.

Mogu se upotrebljavati i kapilarni sustavi za elektroforezu.

— Važu se 2 g agaroze u 100 ml 1 × pufera TAE.

— Zagrijava se u mikrovalnoj peći (oko 2 – 3 minute) kako bi se otopila agaroza.

— Dodaju se dvije kapi etidijeva bromida konačne koncentracije od 0,5 µg/ml.

— Topla otopina prenosi se u opremu za izradu odljevaka od gela.

— Gel se ostavlja kako bi se stvrdnuo.

3. *Gel-elektroforeza*

— Agarozni se gel prenosi u opremu za elektroforezu i uranja u 1 × pufer TAE.

— Puni se 20 µl svakog uzorka u zasebnu jažicu uz dodavanje markera molekularne mase (DNK ljestvica 100 bp, Promega) u raspoloživu jažicu.

— Elektroforeza se provodi na 120 V u trajanju 30 – 45 minuta.

▼**M6**

4. *Vizualizacija produkata amplifikacije*

Ako je etidijev bromid bio inkorporiran u agarozni gel kako je prethodno opisano, produkti DNK-a vidljivi su pod izvorom UV svjetla. Kao druga mogućnost agarozni gel boji se prekrivanjem gela razrijeđenom otopinom etidijeva bromida (0,5 μg/ml u vodi) 30 minuta prije vizualizacije.

▼M6

Dodatak 11.

Smjernica za postupak umjetne oplodnje za koljušku

Cilj je ovog odjeljka opisati postupke za dobivanje oplođenih jajašaca koljuške radi njihove upotrebe u ispitivanju spolnog razvoja riba.

Postupci

Dobivanje sperme od mužjaka

1. Usmrćuje se mužjak dobre boje iz željene populacije.

2. Ribi se sa svake strane seciraju testisi. *Testisi su uobičajeno jako pigmentirane strukture u obliku štapa koje su jasno vidljive na bočnoj središnjoj liniji tijela.* Primjenjuje se bilo koja od metoda navedenih u nastavku.

3. Finim se škarama počinje od kloake i pravi se rez veličine 1 – 1,5 cm jednim potezom pod kutom od približno 45 stupnjeva.

4. Skalpelom se pravi mali rez sa strane ribe malo iza zdjelice i odmah ventralno od bočnih pločica.

5. Testisi se uklanjaju finim hvataljkama i stavljaju u Petrijevu zdjelicu.

6. Svaki se testis prekriva sa 100 µl svježe pripremljene **Hankove konačne otopine** (*).

7. Testisi se britvicom ili skalpelom usitnjavaju. Time se oslobađa sperma te Hankova otopina poprima mliječni izgled.

8. Tekućina koja sadržava spermu dodaje se u cijev uz istovremeno izbjegavanje dodavanja dijelova tkiva testisa prilikom prijenosa pipetom.

9. 800 µl Hankove konačne otopine dodaje se u cijev i dobro miješa.

10. Po potrebi se mužjak može konzervirati fiksiranjem u 100 %-tnom etanolu ili drugom željenom fiksativu. To je osobito važno ako se u studiji određuje roditeljsko podrijetlo potomaka.

Važna napomena: *iako se većinu radnih otopina može pripremiti unaprijed,* ***radnu otopinu 5*** *i kasnije* ***konačnu otopinu*** *potrebno je pripremiti* ***svježe*** *na dan upotrebe.*

Radna otopina 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilirana voda	100 ml

Radna otopina 2

Na_2HPO_4 (anhidridni)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Destilirana voda	100 ml

Radna otopina 3

$CaCl_2$	0,72 g
Destilirana voda	50 ml

(*) Hankova puferirana slana otopina (HBSS):

HBSS je potreban za konzerviranje sperme uz njezinu istovremenu pripremu za oplodnju.

▼M6

Radna otopina 4

$MgSO_4$ $7H_2O$	1,23 g
Destilirana voda	50 ml

Radna otopina 5 (svježe pripremljena)

$NaHCO_3$	0,35 g
Destilirana voda	10 ml

Napomena: ako su neke od prethodno navedenih soli već na raspolaganju, ali s različitim sadržajem vode (npr. $2H_2O$ umjesto anhidridnog), mogu se upotrijebiti, ali prvo se prilagođava masa na temelju molekularne mase.

Za Hankovu se konačnu otopinu kombiniraju sastojci sljedećim redoslijedom:

radna otopina 1	1,0 ml
radna otopina 2	0,1 ml
radna otopina 3	0,1 ml
destilirana voda	8,6 ml
radna otopina 4	0,1 ml
radna otopina 5	0,1 ml.

Dobro se promiješa prije upotrebe.

Oplodnja

1. U željenoj se populaciji identificiraju velike, gravidne ženke; ženke su spremne za istiskivanje tek kada su vidljiva jajašca isturena iz kloake. Spremne ženke imaju karakterističan položaj s „uzdignutom glavom”.

2. Prstom ili palcem nježno se prelazi niz bočnu stranu ribe prema repu kako bi se potaknulo izbacivanje vrećice s jajašcima u Petrijevu zdjelicu. Postupak se ponavlja s druge strane i zatim se riba vraća u akvarij.

3. Jajašca se mogu raširiti (tako da čine jedan sloj) finim kistom. Važno je pokušati što je moguće više jajašaca izložiti spermi tako da je korisno maksimalno povećati površinu jajašaca. Važna napomena: jajašca je potrebno održavati vlažnima tako da se oko njih položi vlažni papirnati ručnik (važno je da jajašca ne dodiruju vodu izravno jer to može dovesti do prijevremenog stvrdnjavanja koriona i sprečavanja oplodnje). Velika je razlika u broju jajašaca koje svaka ženka može proizvesti, ali u prosjeku od pojedinačne gravidne ženke trebalo bi se lako dobiti oko 150 jajašaca.

4. Kistom se 25 µl sperme u Hankovoj smjesi ravnomjerno raspoređuje preko cijele površine jajašaca. Jajašca će se brzo stvrdnuti i promijeniti boju (u roku od jedne minute) nakon početka oplodnje. Ako je procijenjeni broj jajašaca veći od 150, postupak se ponavlja. Slično tome, ako se jajašca ne stvrdnu u roku od jedne minute, dodaje se još sperme. Važna napomena: dodavanjem sperme na poboljšava se nužno stopa oplodnje.

5. Jajašca i otopina sa spermom ostavljaju se najmanje 15 minuta radi „interakcije”, a oplođena jajašca potrebno je staviti u akvarije za izlaganje u roku od 1,5 sati nakon oplodnje.

6. Postupak se ponavlja s drugom ženkom dok se ne prikupi željeni broj jajašaca.

7. Iz prethodne se šarže zadržava nekoliko jajašaca i fiksira u 10 %-tnoj octenoj kiselini.

▼M6

Brojanje i raspoređivanje jajašaca u ispitnim akvarijima

1. Jajašca se ravnomjerno raspoređuju između svake razine obrade kako bi se izbjeglo utjecanje na odabir genetskog materijala. Svaku je šaržu oplođenih jajašaca potrebno tupim instrumentom (npr. širokim entomološkim hvataljkama ili uporabom inokulacijske petlje) razdvojiti u skupine jednake veličine (čiji broj odgovara broju razina obrade). Ako je cilj četiri ponavljanja po obradi, za 20 jajašaca u svakom ponavljanju treba distribuirati 80 jajašaca po akvariju za izlaganje. Važna napomena: preporučuje se dodatnih 20 % (odnosno 96 jajašaca po razini obrade) dok nije sigurno da je postignuta 100 %-tna stopa oplodnje.

2. Jajašca koljuške vrlo su sklona gljivičnim infekcijama izvan gnijezda koje čuva otac. U tom pogledu od kritične je važnosti sva jajašca tretirati metilenskim modrilom tijekom prvih pet dana ispitivanja. Radna se otopina metilenskog modrila priprema u koncentraciji 1 mg/ml i dodaje akvarijima za izlaganje kako bi se dobila maksimalna konačna koncentracija od 2,125 mg/l. Važna napomena: koljuške ne bi trebalo izlagati metilenskom modrilu nakon valjenja pa bi sustav do šestog dana trebao biti bez metilenskog modrila.

3. Jajašca se pregledava svakodnevno i bilježe se sva mrtva ili neoplođena jajašca kao takva. Važna napomena: jajašca nikada ne bi smjela biti izvan vode do valjenja, čak ni u vrlo kratkim razdobljima.

▼M6

C.42. BIORAZGRADIVOST U MORSKOJ VODI

OPĆI UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 306 (1992.). U vrijeme izrade izvornih ispitnih metoda nije bilo poznato u kojoj se mjeri rezultati testova pretraživanja na laku biorazgradivost u kojima su se primjenjivali slatka voda i izlazne otpadne vode ili aktivni mulj kao inokulum mogu primjenjivati na morski okoliš. U tom pogledu zabilježeni su različiti rezultati (npr. (1)).

2. Brojne industrijske otpadne vode, koje sadržavaju različite kemikalije, dolaze u more izravnim ispuštanjem ili preko ušća i rijeka u kojima je vrijeme zadržavanja kratko u odnosu na razdoblje potrebno za potpunu biorazgradnju mnogih prisutnih kemikalija. Zbog sve veće svijesti o potrebi zaštite morskog okoliša od sve većeg opterećenja kemikalijama i potrebi da se procijeni vjerojatna koncentracija kemikalija u moru, razvijene su ispitne metode za biorazgradivost u morskoj vodi.

3. U ovdje opisanim metodama upotrebljava se morska voda kao vodena faza i kao izvor mikroorganizama. U nastojanju da se postigne usklađenost s metodama za laku biorazgradivost u svježoj vodi, provedena su istraživanja ultrafiltrirane i centrifugirane morske vode te primjene morskih sedimenata kao inokuluma. Ta su istraživanja bila neuspješna. Stoga je ispitni medij prirodna morska voda koja je prethodno obrađena kako bi se uklonile grube čestice.

4. Za ocjenu konačne biorazgradivosti metodom protresanja u tikvici moraju se upotrijebiti relativno visoke koncentracije ispitivane tvari zbog slabe osjetljivosti analitičke metode otopljenog organskog ugljika (DOC). Zbog toga je pak potrebno morskoj vodi dodati mineralne nutrijente (N i P) jer bi u protivnome njihovim niskim koncentracijama bilo ograničeno uklanjanje DOC-a. Nutrijente je potrebno dodati i u metodi zatvorenih boca zbog koncentracije dodane ispitivane tvari.

5. Stoga metode nisu ispitivanja na laku biorazgradivost jer se mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje inokulum. Ispitivanjima se isto tako ne simulira morski okoliš jer se dodaju nutrijenti i jer je koncentracija ispitivane tvari puno viša nego što bi bila u moru. Zbog navedenih su razloga metode predložene u okviru novog pododjeljka „Biorazgradivost u morskoj vodi”.

PRIMJENA

6. Rezultatima ispitivanja, koji bi se primjenjivali jer se modelom upotrebe i odlaganja predmetne tvari ukazuje na put do mora, ostavlja se prvi dojam biorazgradivosti u morskoj vodi. Ako je rezultat pozitivan (> 70 % uklanjanja DOC-a, > 60 % teoretske potrošnje kisika (TPK)), može se zaključiti da postoji potencijal za biorazgradnju u morskom okolišu. Međutim, negativnim se rezultatom ne isključuje takav potencijal, već ukazuje na to da su potrebne daljnje studije, na primjer uz primjenu što je moguće niže koncentracije ispitivane tvari.

▼M6

7. U svakom slučaju, ako je za brzinu ili stupanj biorazgradnje u morskoj vodi na određenom mjestu potrebna točnija vrijednost, morat će se primijeniti druge, složenije i sofisticiranije, a time i skuplje metode. Na primjer, mogao bi se primijeniti simulacijski test u kojem se primjenjuje koncentracija ispitivane tvari bliža vjerojatnoj koncentraciji u okolišu. Nadalje, mogla bi se upotrijebiti morska voda koja nije ojačana i prethodno obrađena i koja je uzeta s lokacije od interesa te bi se specifičnom kemijskom analizom mogla pratiti primarna biorazgradnja. Za konačnu biorazgradivost bile bi potrebne tvari označene s pomoću ^{14}C kako bi se mogle izmjeriti brzine nestanka topljivog organskog ^{14}C i proizvodnje $^{14}CO_2$ u realnim koncentracijama u okolišu.

ODABIR METODA

8. Odabir metode ovisi o brojnim čimbenicima, a sljedeća tablica služi kao pomoć pri odabiru. Iako se tvari čija je topljivost u vodi manja od ekvivalenta 5 mg C/l ne mogu ispitivati metodom protresanja u tikvici, slabo se topljive tvari u načelu mogu ispitivati barem metodom zatvorenih boca.

Tablica

prednosti i nedostaci testa protresanjem u tikvici i testa za zatvorenim bocama.

METODA	PREDNOSTI	NEDOSTACI
PROTRESANJE U TIKVICI	— jednostavna aparatura, osim analizatora ugljika — trajanje od 60 dana nije problem — bez interferencije nitrifikacije — može se prilagoditi za hlapljive tvari	— potreban je analizator ugljika — upotreba 5 – 40 mg DOC-a/l, može imati inhibitorni učinak — DOC se teško određuje na niskim koncentracijama u morskoj vodi (učinak klorida) — DOC je ponekad visok u morskoj vodi
ZATVORENE BOCE	— jednostavna aparatura — jednostavno završno određivanje — primjenjuje se niska koncentracija ispitivane tvari (2 mg/l) te se time smanjuje mogućnost inhibicije — jednostavna prilagodba za hlapljive tvari	— može biti teško održavati zrakonepropusnost boca — rast bakterija na stijenkama može dovesti do lažnih vrijednosti — vrijednosti potrošnje O_2 u slijepim probama mogu biti visoke, osobito nakon 28 dana; može se nadvladati starenjem morske vode — moguća interferencija potrošnje O_2 zbog nitrifikacije

METODA PROTRESANJEM U TIKVICI

UVOD

1. Ova je metoda varijanta izmijenjenog testa pretraživanja OECD-a za morsku vodu opisanog u poglavlju C.4.B ovog Priloga (2). Dovršena je kao rezultat međulaboratorijskog ispitivanja koje je za Europsku komisiju (EK) organizirao Danski institut za kakvoću vode (3).

2. Kao i kod prateće metode zatvorenih boca za morski okoliš, rezultate ispitivanja ne treba smatrati pokazateljima lake biorazgradivosti, već ih je potrebno primjenjivati isključivo za dobivanje informacija o biorazgradivosti tvari u morskim okolišima.

▼**M6**

NAČELO METODE

3. Unaprijed utvrđena količina ispitivane tvari otapa se u ispitnom mediju kako bi se dobila koncentracija od 5 – 40 mg otopljenog organskog ugljika (DOC)/l. Ako se poboljšaju granice osjetljivosti analiza organskog ugljika, primjena nižih koncentracija ispitivane tvari može biti korisna, osobito za tvari s inhibitornim učincima. Otopina ispitivane tvari u ispitnom mediju inkubira se uz protresanje u mraku ili pod difuznom rasvjetom u aerobnim uvjetima na fiksnoj temperaturi (koja se održava unutar ± 2 °C) koja je uobičajeno u rasponu od 15- do 20 °C. U slučajevima u kojima je cilj studije simulacija situacija u okolišu, ispitivanja se mogu provesti izvan uobičajenog temperaturnog područja. Preporučeno je maksimalno trajanje ispitivanja oko 60 dana. Nakon razgradnje slijede mjerenja DOC-a (konačna razgradnja), a u nekim slučajevima i specifična analiza (primarna razgradnja).

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

4. Kako bi se utvrdilo može li se ispitivanje primijeniti na određenu tvar, moraju biti poznata neka od njezinih svojstava. Mora se utvrditi sadržaj organskog ugljika tvari, njezina hlapljivost mora biti takva da ne dolazi do znatnih gubitaka tijekom ispitivanja i njezina topljivost u vodi trebala bi biti veća od ekvivalenta 25 – 40 mg C/l. Isto tako, ispitivana tvar ne bi se trebala znatno adsorbirati na staklene površine. Za tumačenje dobivenih rezultata potrebne su informacije o čistoći ili relativnim udjelima glavnih sastojaka ispitivane tvari, osobito ako su vrijednosti blizu razine prolaznosti.

5. Informacije o toksičnosti ispitivane tvari za bakterije, na primjer dobivene mjerenjima u kratkoročnim testovima stope disanja (4), mogu biti korisne za odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija te mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje. Međutim, takve informacije nisu uvijek dovoljne za tumačenje rezultata dobivenih ispitivanjem biorazgradnje te je postupak opisan u stavku 18. prikladniji.

REFERENTNE TVARI

6. Moraju se primijeniti prikladne referentne tvari za provjeru djelovanja mikroba u uzorku morske vode. Natrijev benzoat, natrijev acetat i anilin primjeri su tvari koje se mogu primijeniti u tu svrhu. Referentne tvari moraju se razgraditi u razumno kratkom roku, a u protivnome preporučuje se ponavljanje ispitivanja uz upotrebu drugog uzorka morske vode.

7. U međulaboratorijskom su ispitivanju za EK, u kojem su se uzorci morske vode uzimali na različitim lokacijama i u različito doba godine (3), eksponencijalna faza razvoja (t_L) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tne razgradnje (t_{50}), isključujući eksponencijalnu fazu razvoja, iznosili od jednog do četiri dana, odnosno od jednog do sedam dana za natrijev benzoat. Za anilin je t_L bio u rasponu od nula do deset dana, a t_{50} od jednog do deset dana.

MJERNA OBNOVLJIVOST I OSJETLJIVOST METODE

8. Mjerna obnovljivost metode utvrđena je međulaboratorijskim ispitivanjem (3). Najniža koncentracija ispitivane tvari za koju se ova metoda može primijeniti s analizom DOC-a u velikoj je mjeri određena granicom detekcije analize organskog ugljika (trenutačno oko 0,5 mg C/l) i koncentracijom otopljenog organskog ugljika u upotrijebljenoj morskoj vodi (obično 3 – 5 mg/l za vodu s otvorenog mora). Pozadinska koncentracija DOC-a ne bi

▼M6

trebala prelaziti oko 20 % ukupne koncentracije DOC-a nakon dodavanja ispitivane tvari. Ako to nije izvedivo, pozadinsku koncentraciju DOC-a ponekad je moguće smanjiti starenjem morske vode prije ispitivanja. Ako se metoda primjenjuje samo sa specifičnom kemijskom analizom (kojom se mjeri primarna razgradnja), ispitivač mora navođenjem dodatnih informacija dokumentirati može li se očekivati konačna razgradivost. Navedene se dodatne informacije mogu sastojati od rezultata drugih ispitivanja na laku ili svojstvenu biorazgradivost.

OPIS METODE

Aparatura

9. Uobičajena laboratorijska aparatura i:

a. tresilica s automatskom regulacijom temperature ili smještena u prostoriji s konstantnom temperaturom od 15- do 20 °C koja se održava unutar ± 2 °C za Erlenmeyerove tikvice od 0,5 do 2 litre;

b. Erlenmeyerove tikvice uskog vrata od 0,5 do 2 litre;

c. aparatura za membransku filtraciju ili centrifuga;

d. membranski filtri, 0,2–0,45 μm;

e. analizator ugljika;

f. oprema za specifičnu analizu (po izboru).

Morska voda

10. Uzorak morske vode uzima se temeljito očišćenim spremnikom i prenosi u laboratorij, po mogućnosti u roku od jednog ili dva dana od skupljanja. Tijekom prijenosa temperatura uzorka ne smije znatno prijeći temperaturu koja će se primjenjivati tijekom ispitivanja. Lokacija uzorkovanja precizno se određuje i opisuje s obzirom na status u pogledu onečišćenja i nutrijenata. Posebno se za obalne vode u navedeni opis uključuje i broj heterotrofnih kolonija mikroba i određivanje koncentracija otopljenog nitrata, amonijaka i fosfata.

11. O samom uzorku morske vode navode se sljedeće informacije:

— datum skupljanja,

— dubina skupljanja,

— izgled uzorka, zamućenost itd.,

— temperatura u trenutku skupljanja,

— salinitet.

— DOC,

— vrijeme između skupljanja i upotrebe u ispitivanju.

12. Ako se utvrdi da je sadržaj DOC-a u uzorku morske vode visok (stavak 8.), preporučuje se starenje morske vode u trajanju od približno tjedan dana prije upotrebe. Starenje vode provodi se u aerobnim uvjetima na sobnoj

▼M6

temperaturi u mraku ili pod difuznom rasvjetom. Aerobni uvjeti po potrebi se održavaju blagim dozračivanjem. Tijekom starenja smanjuje se sadržaj lako razgradivog organskog materijala. Međulaboratorijskim ispitivanjem (3) nije utvrđena nikakva razlika između potencijala razgradnje uzoraka starije i svježe skupljene morske vode. Prije upotrebe morska voda prethodno se obrađuje kako bi se uklonile grube čestice, npr. filtracijom kroz najlonski filtar ili grubi papirni filtar (ne kroz membranski filtar ili GF-C filtar) ili taloženjem i pretakanjem. Primijenjeni se postupak mora zabilježiti. Prethodna se obrada provodi nakon starenja ako je provedeno.

Radne otopine za mineralne nutrijente

13. Pripremaju se sljedeće radne otopine s analitički čistim reagensima:

(a)	Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev hidrogen ortofosfat, K_2HPO4	21,75 g
	Dinatrijev hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(b)	Kalcijev klorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(c)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(d)	Željezov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	

Taloženje u otopini (d) može se spriječiti dodavanjem jedne kapi koncentriranog HCl ili 0,4 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA-e, dinatrijeve soli) po litri. Ako se u radnoj otopini stvori talog, treba je zamijeniti svježe pripremljenom otopinom.

Priprema ispitnog medija

14. Dodaje se 1 ml svake od prethodno navedenih radnih otopina po litri prethodno obrađene morske vode.

Inokulum

15. Mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje se specifični inokulum. Određuje se (po izboru) broj heterotrofa koji tvore kolonije u ispitnom mediju morske vode (po mogućnosti i u izvornim uzorcima morske vode), npr. određivanjem broja na pojedinačnim pločicama primjenom morskog agara. To je osobito poželjno kod uzoraka s obalnih ili onečišćenih mjesta. Provjerava se djelovanje heterotrofnih mikroba u morskoj vodi provedbom ispitivanja s referentnom tvari.

▼M6

Priprema tikvica

16. Treba osigurati da je sva staklena oprema temeljito očišćena, ali ne nužno sterilna (npr. da je očišćena alkoholnom klorovodičnom kiselinom) te da je isprana i osušena prije upotrebe kako bi se izbjegla kontaminacija ostacima iz prethodnih ispitivanja. Tikvice isto tako moraju biti očišćene prije prve upotrebe.

17. Ispitivana tvar ocjenjuje se u dvjema paralelnim tikvicama istovremeno zajedno s jednom tikvicom za referentnu tvar. Za određivanje analitičkih slijepih proba dva se puta paralelno provodi slijepa proba bez ispitivane i referentne tvari. Ispitivana tvar otapa se u ispitnom mediju, koji se prikladno mogu dodati s pomoću koncentrirane radne otopine, kako bi se dobile željene početne koncentracije, uobičajeno 5 – 40 mg DOC/l. Referentna tvar uobičajeno se ispituje pri početnoj koncentraciji koja odgovara 20 mg DOC/l. Ako se upotrebljavaju radne otopine ispitivane i/ili referentne tvari, treba osigurati da ne dođe do velike promjene saliniteta morske vode.

18. Ako se mogu očekivati ili se ne mogu isključiti toksični učinci, savjetuje se da se u plan ispitivanja uključi dvostruka paralelna provedba pokusa inhibicije. Ispitivana i referentna tvar dodaju se u istu posudu, pri čemu je koncentracija referentne tvari uobičajeno jednaka kao u kontrolnom ispitivanju (odnosno 20 mg DOC/l) kako bi se omogućila usporedba.

19. U Erlenmeyerove tikvice odmjeravaju se odgovarajuće količine ispitnih otopina (praktična je količina do približno polovice volumena tikvice), nakon čega se svaka tikvica prekriva (npr. aluminijskom folijom) tako da se omogući izmjena plinova iz tikvice i okolnog zraka. (Čepovi od vate nisu prikladni ako se primjenjuje analiza DOC-a). Posude se stavljaju u mućkalicu i neprekidno protresaju blagom brzinom (npr. 100 o/min) tijekom čitavog ispitivanja. Temperatura se održava (15 – 20 °C i unutar ± 2 °C), a posude se zaštićuju od svjetla kako bi se spriječio rast algi. Treba osigurati da u zraku nema toksičnih materijala.

Fizikalno-kemijsko kontrolno ispitivanje (po izboru)

20. Ako se sumnja u abiotičku razgradnju ili mehanizme gubitaka, kao što su hidroliza (problem samo sa specifičnom analizom), hlapljenje ili adsorpcija, savjetuje se provedba fizikalno-kemijskoga kontrolnog pokusa. On se može provesti dodavanjem živina (II) klorida ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) posudama s ispitivanom tvari kako bi se prekinulo djelovanje mikroba. Znatnim smanjenjem koncentracije DOC-a ili specifične tvari u fizikalno-kemijskom kontrolnom ispitivanju ukazuje se na abiotičke mehanizme uklanjanja. (Ako se upotrebljava živin klorid, potrebno je obratiti pozornost na interferencije ili trovanje katalizatora u analizi DOC-a.)

Broj tikvica

21. U tipičnom ispitivanju upotrebljavaju se sljedeće tikvice:

tikvice 1 i 2	sadržavaju ispitivanu tvar (ispitna suspenzija),
tikvice 3 i 4	sadržavaju samo morsku vodu (slijepa proba),
tikvica 5	sadržava referentnu tvar (kontrola postupka),
tikvica 6	sadržava ispitivanu i referentnu tvar (kontrola toksičnosti) – po izboru,
tikvica 7	sadržava ispitivanu tvar i sredstvo za sterilizaciju (abiotička sterilna kontrola) – po izboru.

([1]) Živin (II) klorid ($HgCl_2$) vrlo je toksična tvar s kojom je potrebno postupati uz prikladne mjere opreza. Tekući otpad koji sadržava tu kemikaliju trebao bi se zbrinjavati na odgovarajući način; ne bi se trebao ispuštati u sustav otpadnih voda.

▼M6

Analiza DOC-a

22. Tijekom ispitivanja uzorci se u prikladnim intervalima uzimaju za analizu DOC-a (Dodatak 1.). Uzorci se uvijek uzimaju na početku ispitivanja (0. dan) i zatim 60. dana. Za opis vremenskog tijeka razgradnje ukupno je potrebno minimalno pet uzoraka. Budući da brzina biorazgradnje varira, nije moguće navesti fiksan vremenski raspored uzorkovanja. DOC se određuje dva puta paralelno na svakom uzorku.

Uzorkovanje

23. Potreban volumen uzoraka ovisi o analitičkoj metodi (specifična analiza), upotrijebljenom analizatoru ugljika i odabranom postupku (membranska filtracija ili centrifugiranje) za obradu uzorka prije određivanja ugljika (stavci 25. i 26.). Prije uzorkovanja potrebno je osigurati da je ispitni medij dobro promiješan i da je sav materijal koji se prilijepi na stijenke otopljen ili suspendiran.

24. Membranska filtracija ili centrifugiranje provodi se odmah nakon uzorkovanja. Filtrirani ili centrifugirani uzorci po potrebi se pohranjuju na 2 – 4 °C do 48 sati ili ispod – 18 °C ako je riječ o duljim razdobljima (ako je poznato da to neće imati učinka na tvar, ona se acidifira na pH-vrijednost 2 prije pohranjivanja).

25. Prikladni su membranski filtri (0,2 – 0,45 μm) koji ne otpuštaju ugljik i ne adsorbiraju tvar tijekom filtracije, npr. polikarbonatni membranski filtri. Neki su membranski filtri impregnirani surfaktantima radi hidrofilizacije i mogu otpuštati znatne količine otopljenog ugljika. Takvi se filtri pripremaju kuhanjem u deioniziranoj vodi tijekom triju uzastopnih jednosatnih razdoblja. Filtri se nakon kuhanja pohranjuju u deioniziranoj vodi. Prvih se 20 ml filtrata odbacuje.

26. Kao alternativa membranskoj filtraciji može se odabrati centrifugiranje uzoraka. Uzorci se centrifugiraju na 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4000 g) 15 minuta, po mogućnosti u hladnoj centrifugi.

Napomena: čini se da diferencijacija ukupnog organskog ugljika (TOC) u odnosu na DOC (TOC/DOC) centrifugiranjem pri vrlo niskim koncentracijama ne djeluje jer se njome ne uklanjaju sve bakterije ili se ugljik ponovno otapa kao dio bakterijske plazme. Čini se da je pogreška centrifugiranja pri višim ispitnim koncentracijama (> 10 mg C po litri) usporedivo manja.

Učestalost uzorkovanja

27. Ako se analize provode odmah nakon uzorkovanja, vrijeme sljedećeg uzorkovanja ocjenjuje se uzimajući u obzir rezultate analitičkog određivanja.

28. Ako se uzorci čuvaju (stavak 24.) za kasniju analizu, treba uzeti više uzoraka od minimalno potrebnih pet. Prvo se analiziraju zadnji uzorci, a postupnim odabirom odgovarajućih uzoraka za analizu obrnutim redoslijedom moguće je dobiti dobar opis krivulje biorazgradnje s relativno malim brojem analitičkih određivanja. Ako do kraja ispitivanja nije došlo do razgradnje, nije potrebno analizirati daljnje uzorke i u toj se situaciji strategijom obrnutog redoslijeda mogu uštedjeti znatni troškovi analize.

▼M6

29. Ako je opaženo da je krivulja dosegnula plato prije 60. dana, ispitivanje se završava. Ako je očito da je razgradnja počela prije 60. dana, ali još nije dosegnula plato, pokus se produljuje za dodatno razdoblje.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

30. Analitički se rezultati bilježe u priloženi obrazac za dostavu podataka (Dodatak 2.) i izračunavaju se vrijednosti biorazgradnje za ispitivanu i referentnu tvar na temelju sljedeće jednadžbe:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

pri čemu je:

D_t = razgradnja u postotku uklanjanja DOC-a ili specifične tvari u vremenu t,

C_o = početna koncentracija DOC-a ili specifične tvari u ispitnom mediju,

C_t = koncentracija DOC-a ili specifične tvari u ispitnom mediju u vremenu t,

$C_{bl(0)}$ = početna koncentracija DOC-a ili specifične tvari u slijepoj probi,

$C_{bl(t)}$ = koncentracija DOC-a ili specifične tvari u slijepoj probi u vremenu t.

31. Razgradnja se navodi kao postotak uklanjanja DOC-a (konačna razgradnja) ili uklanjanja specifične tvari (primarna razgradnja) u vremenu t. Koncentracije DOC-a izračunavaju se do najbližeg 0,1 mg po litri, a srednje vrijednosti D_t zaokružuju se na najbliži cijeli postotak.

32. Tijek razgradnje grafički se prikazuje dijagramom kako je prikazano na slici u odjeljku „Valjanost i tumačenje rezultata”. Ako su na raspolaganju dostatni podaci, iz krivulje se izračunava eksponencijalna faza razvoja (t_L) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja od kraja eksponencijalne faze razvoja (t_{50}).

Izvješće o ispitivanju

33. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije.

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— podatke za identifikaciju.

Uvjeti ispitivanja:

— lokaciju i opis mjesta uzorkovanja, stanje onečišćenja i nutrijenata (broj kolonija, nitrat, amonijak, fosfat po potrebi),

— svojstva uzorka (datum uzorkovanja, dubinu, izgled, temperaturu, salinitet, DOC (po izboru), vrijeme od skupljanja do upotrebe u ispitivanju),

▼M6

— metodu (ako je primijenjena) za starenje morske vode,

— metodu primijenjenu za prethodnu obradu (filtraciju/taloženje) morske vode,

— metodu primijenjenu za određivanje DOC-a,

— metodu primijenjenu za specifičnu analizu (po izboru),

— metodu primijenjenu za određivanje broja heterotrofa u morskoj vodi (metodu određivanja broja na pojedinačnim pločicama ili alternativni postupak) (po izboru),

— druge metode (po izboru) primijenjene za opis morske vode (mjerenja adenozin-trifosfata (ATP) itd.).

Rezultati:

— analitičke podatke zabilježene u obrascu za dostavu podataka (Dodatak 2.),

— tijek ispitivanja razgradnje predstavljen je grafičkim dijagramom kojim su prikazani eksponencijalna faza razvoja (t_L), nagib i vrijeme (počevši od kraja eksponencijalne faze razvoja) potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja (t_{50}). Eksponencijalna faza razvoja može se procijeniti grafički kako je prikazano na slici u odjeljku „Valjanost i tumačenje rezultata” ili se prikladno može uzeti kao vrijeme potrebno za 10 %-tnu razgradnju,

— postotak razgradnje izmjerene nakon 60 dana ili na kraju ispitivanja.

Rasprava o rezultatima.

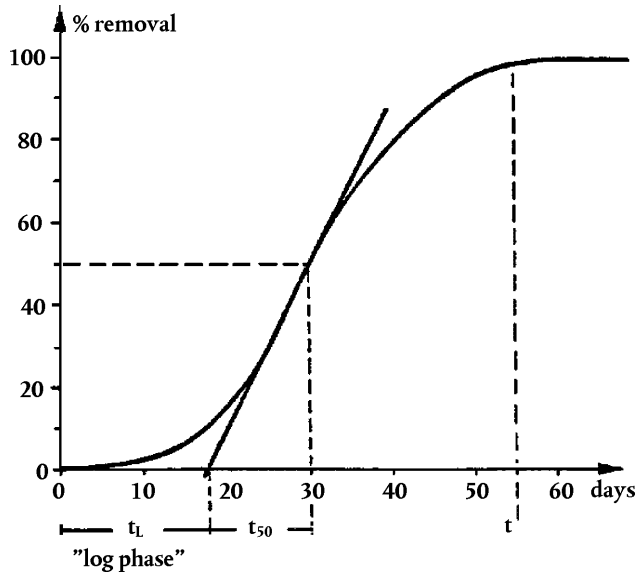
Valjanost i tumačenje rezultata

34. Rezultati dobiveni na temelju referentnih tvari, npr. natrijeva benzoata, natrijeva acetata ili anilina, trebali bi biti usporedivi s rezultatima dobivenima međulaboratorijskim ispitivanjem (3) (vidi odjeljak „Referentne tvari” stavak 7.). Ako su rezultati dobiveni na temelju referentnih tvari atipični, ispitivanje je potrebno ponoviti uz upotrebu drugog uzorka morske vode. Iako se rezultati testova inhibicije možda ne mogu uvijek izravno tumačiti zbog doprinosa ispitivane tvari DOC-u, znatno smanjenje brzine uklanjanja ukupnog DOC-a u odnosu na brzinu iz kontrole pozitivan je znak toksičnih učinaka.

35. Zbog relativno visokih upotrijebljenih ispitnih koncentracija u odnosu na većinu prirodnih sustava (i stoga nepovoljan omjer koncentracija ispitivanih tvari i drugih izvora ugljika) metoda se smatra preliminarnim ispitivanjem koje se može primijeniti kako bi se pokazalo je li tvar lako biorazgradiva ili nije. Shodno tome, nizak rezultat ne znači nužno da ispitivana tvar nije biorazgradiva u morskim okolišima, već pokazuje da će za utvrđivanje navedenoga biti potrebno obaviti dodatan posao.

Primjer pokusa teoretske razgradnje kojim se ilustrira izvediv način procjene vrijednosti t_L (duljine „eksponencijalne faze razvoja”) i t_{50} (vremenskog intervala počevši od t_L) potrebnog za postizanje 50 %-tnog uklanjanja prikazan je na slici u nastavku.

▼M6



METODA ZATVORENIH BOCA

UVOD

1. Ova je metoda varijanta testa sa zatvorenim bocama (5) i dovršena je kao rezultat međulaboratorijskog ispitivanja koje je za Europsku komisiju (EK) organizirao Danski institut za kakvoću vode (3).

2. Kao i kod prateće metode protresanja u tikvici za morski okoliš, rezultate ispitivanja ne treba smatrati pokazateljima lake biorazgradivosti, već ih je potrebno primjenjivati isključivo za dobivanje informacija o biorazgradivosti tvari u morskim okolišima.

NAČELO METODE

3. Unaprijed određena količina ispitivane tvari otapa se u ispitnom mediju pri uobičajenoj koncentraciji od 2 – 10 mg ispitivane tvari po litri (može se upotrijebiti jedna koncentracija ili više njih). Otopina se drži u napunjenoj i zatvorenoj boci u mraku u kupelji ili kućištu s konstantnom temperaturom koja se održava unutar ± 1 °C u rasponu od 15- do 20 °C. U slučajevima u kojima je cilj studije simulacija situacija u okolišu, ispitivanja se mogu provesti izvan uobičajenog temperaturnog područja pod uvjetom da su za održavanje temperature predviđene prikladne prilagodbe. Nakon razgradnje slijedi analiza kisika u razdoblju od 28 dana.

4. Međulaboratorijskim se ispitivanjem pokazalo da ako je ispitivanje trajalo dulje od 28 dana, nisu bile prikupljene nikakve korisne informacije, u većini slučajeva zbog jakih interferencija. Vrijednosti biološke potrošnje kisika (BPK) u slijepim probama bile su pretjerano visoke vjerojatno zbog rasta na stijenkama prouzročenog izostankom miješanja i zbog nitrifikacije. Stoga se preporučuje trajanje od 28 dana, ali ako vrijednost BPK-a u slijepim probama ostane unutar granice od 30 posto (stavci 15. i 40.), ispitivanje se može produljiti.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

5. Kako bi se utvrdilo može li se ispitivanje primijeniti na određenu tvar, moraju biti poznata neka od njezinih svojstava. Za izračun teoretske potrošnje kisika (TPK) potrebna je empirijska formula (vidi Dodatak 3.); u protivnom se kao referentna vrijednost mora odrediti kemijska potrošnja kisika (KPK) tvari. Primjena je KPK-a manje zadovoljavajuća jer se neke tvari ne oksidiraju potpuno u ispitivanju KPK-a.

▼M6

6. Topljivost tvari trebala bi biti najmanje 2 mg/l, iako se u načelu mogu ispitivati i slabije topljive tvari (npr. primjenom ultrazvučne obrade) kao i hlapljive tvari. Za tumačenje dobivenih rezultata potrebne su informacije o čistoći ili relativnim udjelima glavnih sastojaka ispitivane tvari, osobito ako su vrijednosti blizu razine prolaznosti.

7. Informacije o toksičnosti ispitivane tvari za bakterije, npr. dobivene mjerenjima u kratkoročnim testovima disanja (4), mogu biti vrlo korisne za odabir odgovarajućih ispitnih koncentracija te mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje. Međutim, takve informacije nisu uvijek dovoljne za tumačenje rezultata dobivenih ispitivanjem biorazgradnje te je postupak opisan u stavku 27. prikladniji.

REFERENTNE TVARI

8. Moraju se primijeniti prikladne referentne tvari za provjeru djelovanja mikroba u uzorku morske vode. U tu se svrhu mogu upotrebljavati (na primjer) anilin, natrijev acetat ili natrijev benzoat. Do razgradnje navedenih tvari od najmanje 60 posto (njihova TPK-a) mora doći u razumno kratkom roku, a u protivnom se preporučuje ponavljanje ispitivanja s drugim uzorkom morske vode.

9. U međulaboratorijskom su ispitivanju za EK, u kojem su se uzorci morske vode uzimali na različitim lokacijama i u različito doba godine, eksponencijalna faza razvoja (t_L) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tne razgradnje (t_{50}), isključujući eksponencijalnu fazu razvoja, iznosili od nula do dva dana odnosno od jednog do četiri dana za natrijev benzoat. Za anilin vrijednosti t_L i t_{50} iznosile su od nula do sedam odnosno od dva do 12 dana.

MJERNA OBNOVLJIVOST

10. Mjerna obnovljivost metoda utvrđena je međulaboratorijskim ispitivanjem za EK (3).

OPIS METODE

Aparatura

11. Uobičajena laboratorijska oprema i:

(a) mogu se upotrijebiti staklene boce BPK sa staklenim čepovima od 250 – 300 ml ili boce uskog vrata od 250 ml sa staklenim čepovima;

(b) nekoliko boca od dvije, tri ili četiri litre s označenim litrama za pripremu pokusa i za punjenje boca BPK;

(c) vodena kupelj ili prostorija s konstantnom temperaturom (± 1 °C) bez svjetla;

(d) oprema za analizu otopljenog kisika;

(e) membranski filtri, 0,2–0,45 μm;

(f) oprema za specifičnu analizu (po izboru).

Morska voda

12. Uzorak morske vode uzima se temeljito očišćenim spremnikom i prenosi u laboratorij, po mogućnosti u roku od jednog ili dva dana od skupljanja. Tijekom prijenosa temperatura uzorka ne smije znatno prijeći temperaturu koja će se primjenjivati tijekom ispitivanja.

▼M6

13. Lokacija uzorkovanja precizno se određuje i opisuje s obzirom na status u pogledu onečišćenja i nutrijenata. Posebno se za obalne ili onečišćene vode u navedeni opis uključuje i broj heterotrofnih kolonija mikroba i određivanje koncentracija otopljenog nitrata, amonijaka i fosfata.

14. O samom uzorku morske vode navode se sljedeće informacije:

— datum skupljanja,

— dubina skupljanja,

— izgled uzorka, zamućenost itd.,

— temperatura u trenutku skupljanja,

— salinitet.

— otopljeni organski ugljik (DOC),

— vrijeme između skupljanja i upotrebe u ispitivanju.

15. Ako se utvrdi da je sadržaj DOC-a u uzorku visok ili ako se smatra da bi BPK u slijepim probama nakon 28 dana bio viši od 30 posto od postotka referentne tvari, preporučuje se starenje morske vode u trajanju od približno tjedan dana prije upotrebe.

16. Starenje uzorka provodi se u aerobnim uvjetima na sobnoj temperaturi u mraku ili pod difuznom rasvjetom. Aerobni se uvjeti po potrebi održavaju blagim dozračivanjem. Tijekom starenja smanjuje se sadržaj lako razgradivog organskog materijala. Međulaboratorijskim ispitivanjem (3) nije utvrđena nikakva razlika između potencijala razgradnje uzoraka starije i svježe skupljene morske vode.

17. Prije upotrebe morska se voda prethodno obrađuje kako bi se uklonile grube čestice, npr. filtracijom kroz najlonski filtar ili grubi papirni filtar (ne kroz membranski filtar ili GF-C filtar) ili taloženjem i pretakanjem. Primijenjeni se postupak bilježi. Prethodna se obrada provodi nakon starenja ako je provedeno.

Radne otopine za mineralne nutrijente

18. Pripremaju se sljedeće radne otopine s analitički čistim reagensima:

(a)	kalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikalijev hidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatrijev hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(b)	kalcijev klorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(c)	magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	
(d)	željezov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Otapa se i miješa do jedne litre s destiliranom vodom.	

▼M6

Taloženje u otopini (d) može se spriječiti dodavanjem jedne kapi koncentriranog HCl ili 0,4 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA-e, dinatrijeve soli) po litri. Ako se u radnoj otopini stvori talog, treba je zamijeniti svježe pripremljenom otopinom.

Priprema ispitnog medija

19. Po litri prethodno obrađene morske vode dodaje se 1 ml svake od prethodno navedenih radnih otopina. Ispitni medij zasićuje se zrakom na ispitnoj temperaturi dozračivanjem čistim komprimiranim zrakom oko 20 minuta. Određuje se koncentracija otopljenog kisika u svrhu kontrole. Zasićena koncentracija otopljenog kisika kao funkcija saliniteta i temperature može se očitati iz nomograma priloženog ovoj ispitnoj metodi (Dodatak 4.).

Inokulum

20. Mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje se specifični inokulum. Određuje se (po izboru) broj heterotrofa koji tvore kolonije u ispitnom mediju morske vode (po mogućnosti i u izvornom uzorku morske vode), npr. određivanjem broja na pojedinačnim pločicama primjenom morskog agara. To je osobito poželjno kod uzoraka s obalnih ili onečišćenih mjesta. Provjerava se djelovanje heterotrofnih mikroba u morskoj vodi provedbom ispitivanja s referentnom tvari.

Priprema ispitnih boca

21. Provode se sve potrebne manipulacije uključujući starenje i prethodnu obradu morske vode na odabranoj ispitnoj temperaturi između 15 i 20 °C kako bi se osigurala čistoća, ali ne i sterilnost cjelokupne staklene opreme.

22. Pripremaju se skupine boca BPK za određivanje BPK-a ispitivane i referentne tvari u simultanim pokusnim nizovima. Sve se analize provode u dvjema paralelnim bocama (slijepe probe, referentna i ispitivana tvar), odnosno pripremom dviju boca za svako određivanje. Analize se provode najmanje 0., 5., 15. i 28. dana (četiri određivanja). Pri analizi kisika za četiri je određivanja potrebno ukupno $3 \times 2 \times 4 = 24$ boce (slijepe probe, referentna i ispitivana tvar) i oko osam litara ispitnog medija (za jednu koncentraciju ispitivane tvari).

23. U velikim bocama dostatnog volumena zasebno se pripremaju otopine ispitivane i referentne tvari (stavak 11.) tako da se prvo doda ispitivana i referentna tvar izravno ili upotrebom koncentrirane radne otopine u djelomično napunjene velike boce. Dodaje se još ispitnog medija kako bi se dobila konačna željena koncentracija. Ako se upotrebljavaju radne otopine ispitivane i/ili referentne tvari, treba osigurati da ne dođe do znatne promjene saliniteta morske vode.

24. Koncentracije ispitivane i referentne tvari odabiru se uzimajući u obzir:

(a) topljivost otopljenog kisika u morskoj vodi pri prevladavajućoj ispitnoj temperaturi i salinitetu (vidi priloženi nomogram u Dodatku 4.);

(b) BPK morske vode u slijepim probama i

(c) očekivanu biorazgradivost ispitivane tvari.

▼M6

25. Na 15 °C i 20 °C te pri salinitetu od 32 promila (oceanska voda) topljivost je otopljenog kisika oko 8,1 odnosno 7,4 mg/l. Potrošnja kisika morske vode (disanje u slijepim probama) može biti 2 mg O_2/l ili više ako morska voda nije bila podvrgnuta starenju. Stoga, kako bi se osiguralo da nakon oksidacije ispitivane tvari ostane znatna koncentracija kisika, primjenjuje se početna koncentracija ispitivane tvari od oko 2–3 mg/l (ovisno o TPK-u) za tvari za koje se očekuje da će se potpuno razgraditi u uvjetima ispitivanja (kao što su referentne tvari). Slabije razgradive tvari ispituju se pri višim koncentracijama, do oko 10 mg/l, pod uvjetom da nema toksičnih učinaka. Provedba paralelnih ispitivanja s niskom (oko 2 mg/l) i visokom (oko 10 mg/l) koncentracijom ispitivane tvari može biti korisna.

26. Kisik u slijepoj probi mora se odrediti paralelno u bocama koje ne sadržavaju ispitivanu ili referentnu tvar.

27. Ako se određuju inhibitorni učinci, priprema se sljedeći niz otopina u zasebnim velikim bocama (stavak 13.):

(a) 2 mg po litri lako razgradive tvari, npr. bilo koje od navedenih referentnih tvari;

(b) x mg po litri ispitivane tvari (x je obično 2);

(c) 2 mg po litri lako razgradive tvari plus x mg po litri ispitivane tvari.

Fizikalno-kemijsko kontrolno ispitivanje (po izboru)

28. Ako se upotrebljava opcija primjene specifične analize, može se provesti fizikalno-kemijski pokus kako bi se provjerilo je li ispitivana tvar uklonjena abiotičkim mehanizmima poput hidrolize ili adsorpcije. Fizikalno-kemijsko kontrolno ispitivanje može se provesti dodavanjem živina (II) klorida ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) dvjema paralelnim tikvicama s ispitivanom tvari kako bi se prekinulo djelovanje mikroba. Znatnim smanjenjem koncentracije specifične tvari tijekom ispitivanja ukazuje se na abiotičke mehanizme uklanjanja.

Broj boca BPK u tipičnom ispitivanju

29. U tipičnom ispitivanju upotrebljavaju se sljedeće boce:

— najmanje osam boca koje sadržavaju ispitivanu tvar,

— najmanje osam boca koje sadržavaju samo morsku vodu ojačanu nutrijentima,

— najmanje osam boca koje sadržavaju referentnu tvar i po potrebi

— šest boca koje sadržavaju ispitivanu i referentnu tvar (kontrola toksičnosti).

POSTUPAK

30. Odmah nakon pripreme svaka se otopina ispušta iz donje četvrtine (ne s dna) odgovarajuće velike boce kako bi se napunila odgovarajuća skupina boca BPK. Nulte se kontrole (u nultom vremenu) odmah analiziraju u pogledu otopljenog kisika (stavak 33.) ili se čuvaju za kasniju kemijsku analizu taloženjem s $MnCl_2$ (manganovim (II) kloridom) i NaOH (natrijevim hidroksidom).

([1]) Živin (II) klorid ($HgCl_2$) vrlo je toksična tvar s kojom je potrebno postupati uz prikladne mjere opreza. Tekući otpad koji sadržava tu kemikaliju trebao bi se zbrinjavati na odgovarajući način; ne bi se trebao ispuštati izravno u sustav otpadnih voda.

▼M6

31. Preostale se paralelne boce BPK inkubiraju na ispitnoj temperaturi (15–20 °C), drže u mraku i uklanjaju iz prostora inkubacije u odgovarajućim vremenskim intervalima (npr. minimalno nakon 5., 15. i 28. dana) te analiziraju u pogledu otopljenog kisika (stavak 33.).

32. Uzorci za specifičnu analizu filtriraju se kroz membranski filtar (0,2–0,45 μm) ili centrifugiraju 15 minuta (po izboru). Ako se ne analiziraju odmah, pohranjuju se do 48 sati na 2–4 °C ili dulje na – 18 °C (ako je poznato da to neće imati učinka na ispitivanu tvar, ona se acidifira na pH-vrijednost 2 prije pohranjivanja).

Određivanje otopljenog kisika

33. Koncentracija otopljenog kisika određuje se kemijskom ili elektro-kemijskom metodom priznatom na nacionalnoj ili međunarodnoj razini.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

34. Analitički rezultati bilježe se u priložene obrasce za dostavu podataka (Dodatak 5.).

35. BPK se izračunava kao razlika u potrošnji kisika između slijepe probe i otopine ispitivane tvari u uvjetima ispitivanja. Neto potrošnja kisika dijeli se s koncentracijom (w/v) tvari kako bi se BPK izrazio kao mg BPK/mg ispitivane tvari. Razgradnja je definirana kao omjer biokemijske potrošnje kisika i po mogućnosti teoretske potrošnje kisika (TPK) ili kemijske potrošnje kisika (KPK) i izražena kao postotak (vidi stavak 36.).

36. Vrijednosti biorazgradnje izračunavaju se za svako vrijeme uzorkovanja za ispitivanu i referentnu tvar na temelju jedne od sljedećih dviju jednadžbi:

$$\%\ biorazgradnje = \frac{mg\ O_2/mg\ ispitivane\ tvari}{mg\ TPK/mg\ ispitivane\ tvari} \times 100$$

$$\%\ biorazgradnje = \frac{mg\ O_2/mg\ ispitivane\ tvari}{mg\ KPK/mg\ ispitivane\ tvari} \times 100$$

pri čemu je:

TPK = teoretska potrošnja kisika (za izračun vidi Dodatak 3.)

KPK = kemijska potrošnja kisika određena pokusima.

Napomena: Ponekad se dvama načinima izračuna (kao postotak TPK-a ili postotak KPK-a) ne dobivaju jednaki rezultati; prednost se daje primjeni TPK-a jer neke tvari ne oksidiraju potpuno u ispitivanju KPK-a.

37. Tijek ispitivanja razgradnje grafički se prikazuje dijagramom (vidi primjer u odjeljku „Valjanost i tumačenje rezultata”). Ako su na raspolaganju dostatni podaci, iz krivulje biorazgradnje izračunavaju se eksponencijalna faza razvoja (t_L) i vrijeme (t_{50}) potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja od kraja eksponencijalne faze razvoja.

38. Ako se primjenjuje specifična analiza (po izboru), navodi se postotak primarne razgradnje kao postotak uklanjanja specifične tvari u razdoblju ispitivanja (uz korekciju za analitičke slijepe probe).

▼M6

Izvješće o ispitivanju

39. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije.

Ispitivana tvar:

— fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— podatke za identifikaciju.

Uvjeti ispitivanja:

— lokaciju i opis mjesta uzorkovanja: stanje onečišćenja i nutrijenata (broj kolonija, nitrat, amonijak, fosfat po potrebi),

— svojstva uzorka (datum uzorkovanja, dubinu, izgled, temperaturu, salinitet, DOC (po izboru), vrijeme od skupljanja do upotrebe u ispitivanju),

— metodu (ako je primijenjena) za starenje morske vode,

— metodu primijenjenu za prethodnu obradu (filtraciju/taloženje) morske vode,

— metodu primijenjenu za određivanje KPK-a (ako je provedeno),

— metodu primijenjenu za mjerenja kisika,

— postupak dispergiranja za tvari koje su slabo topljive u uvjetima ispitivanja,

— metodu primijenjenu za određivanje broja heterotrofa u morskoj vodi (metodu određivanja broja na pojedinačnim pločicama ili alternativni postupak),

— metodu primijenjenu za određivanje DOC-a u morskoj vodi (po izboru),

— metodu primijenjenu za specifičnu analizu (po izboru),

— druge neobvezne metode primijenjene za opis morske vode (mjerenja ATP-a itd.).

Rezultati:

— analitičke podatke zabilježene u obrascu za dostavu podataka (priložen u Dodatku 5.),

— tijek ispitivanja razgradnje predstavljen grafički dijagramom kojim su prikazani eksponencijalna faza razvoja (t_L), nagib i vrijeme (počevši od kraja eksponencijalne faze razvoja) potrebno za postizanje 50 %-tne konačne potrošnje kisika prouzročene oksidacijom ispitivane tvari (t_{50}). Eksponencijalna faza razvoja može se procijeniti grafički kako je prikazano na priloženoj slici ili se prikladno može uzeti kao vrijeme potrebno za 10 %-tnu razgradnju,

— postotak razgradnje izmjerene nakon 28 dana.

Rasprava o rezultatima.

Valjanost i tumačenje rezultata

40. Disanje u slijepoj probi ne bi trebalo prelaziti 30 posto kisika u ispitnoj boci. Ako se navedeni kriterij ne može ispuniti upotrebom svježe skupljene morske vode, mora se provesti starenje (stabilizacija) morske vode prije upotrebe.

41. Potrebno je uzeti u obzir mogućnost da na rezultate mogu utjecati tvari koje sadržavaju dušik.

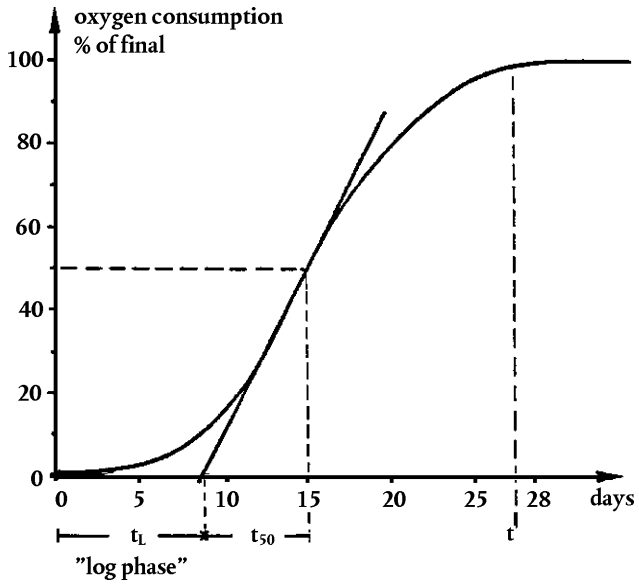
▼M6

42. Rezultati dobiveni na temelju referentnih tvari, odnosno natrijeva benzoata i anilina trebale bi biti usporedivi s rezultatima dobivenima međulaboratorijskim ispitivanjem (3) (stavak 9.). Ako su rezultati dobiveni na temelju referentnih tvari atipični, ispitivanje je potrebno ponoviti uz upotrebu drugog uzorka morske vode.

43. Može se smatrati da ispitivana tvar ima inhibitorni učinak na bakterije (pri upotrijebljenoj koncentraciji) ako je BPK smjese referentne i ispitivane tvari manji od zbroja BPK-a zasebnih otopina dviju tvari.

44. Zbog relativno visokih upotrijebljenih ispitnih koncentracija u odnosu na većinu prirodnih sustava i stoga nepovoljan omjer koncentracija ispitivane tvari i drugih izvora ugljika metoda se smatra preliminarnim ispitivanjem koje se može primijeniti kako bi se pokazalo je li tvar lako biorazgradiva ili nije. Shodno tome, nizak rezultat ne znači nužno da ispitivana tvar nije biorazgradiva u morskim okolišima, već ukazuje na to da će za utvrđivanje navedenoga biti potrebno provesti dodatne radnje.

Primjer pokusa teoretske razgradnje kojim se prikazuje izvediv način procjene vrijednosti tL (duljine „eksponencijalne faze razvoja") i t_{50}, odnosno vremenskog intervala (počevši od t_L) potrebnog za postizanje 50 %-tne konačne potrošnje kisika prouzročene oksidacijom ispitivane tvari nalazi se u nastavku.



LITERATURA

(1) de Kreuk, J .F., i Hanstveit, A. O. (1981.) Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6), 561. – 573.

(2) Metoda C.4-B ovog Priloga: Određivanje „lake" biorazgradivosti, dio III, Izmijenjeni test pretraživanja OECD.

(3) Nyholm, N., i Kristensen, P. (1987.) Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, ožujak 1987., Komisija Europskih zajednica.

(4) Poglavlje C.11. ovog Priloga: Aktivni mulj, test inhibicije disanja (oksidacija ugljika i amonijaka).

(5) Metoda C.4.-E ovog Priloga: Određivanje „lake" biorazgradivosti, dio VI., Test sa zatvorenim bocama.

▼M6

Dodatak 1.

Određivanje organskog ugljika u morskoj vodi

METODA PROTRESANJEM U TIKVICI

Za određivanje organskog ugljika uzorka vode organski spojevi u uzorku oksidiraju u ugljikov dioksid primjenom jedne od triju sljedećih tehnika:

— mokre oksidacije persulfatom / UV zračenjem,

— mokre oksidacije persulfatom / povišenom temperaturom (116 – 130 °C),

— izgaranja.

Nastali CO_2 kvantitativno se određuje infracrvenom spektrometrijom ili titrimetrijom. Druga mogućnost reduciranje je CO_2 u metan, koji se kvantitativno određuje ionizacijskim detektorom plamena (FID).

Metoda oksidacije persulfatom / UV zračenjem uobičajeno se primjenjuje za analizu „čiste” vode s niskim sadržajem čestica. Druge dvije metode mogu se primjenjivati na većinu vrsta uzoraka vode, pri čemu je oksidacija persulfatom / povišenom temperaturom najprikladnija za uzorke niske razine, dok se tehnika izgaranja primjenjuje za uzorke čiji je sadržaj nehlapljivog organskog ugljika (NVOC) veći od 1 mg C/l.

Interferencije

Sve tri metode ovise o eliminaciji ili kompenzaciji anorganskog ugljika (IC) prisutnog u uzorku. Uklanjanje CO_2 iz acidificiranog uzorka najčešće je primijenjena metoda za eliminaciju IC-a, iako ono dovodi do gubitka hlapljivih organskih spojeva (1). Potpuna eliminacija ili kompenzacija IC-a moraju se osigurati za svaku matricu uzorka, a pored NVOC-a mora se odrediti i hlapljivi organski ugljik (VOC), ovisno o vrsti uzorka.

Visoke koncentracije klorida dovode do smanjenja učinkovitosti oksidacije u slučaju primjene metode oksidacije persulfatom / UV zračenjem (2). Međutim, ta se interferencija može ukloniti primjenom oksidacijskog reagensa modificiranog dodavanjem živina (II) nitrata. Preporučuje se upotreba maksimalnog prihvatljivog volumena uzorka za ocjenjivanje svih vrsta uzoraka koji sadržavaju klorid. Visoke koncentracije soli u analiziranom uzorku u metodi izgaranja mogu dovesti do prekrivanja katalizatora solima i prekomjerne korozije cijevi za izgaranje. Potrebno je poduzeti mjere opreza u skladu s priručnikom proizvođača.

Jako zamućeni uzorci kao i uzorci koji sadržavaju čestice možda neće potpuno oksidirati u slučaju primjene metode oksidacije persulfatom / UV zračenjem.

Primjer prikladne metode

Nehlapljivi organski ugljik određuje se oksidacijom persulfatom / UV zračenjem i naknadnim kvantitativnim određivanjem nastalog CO_2 nedisperzivnom infracrvenom spektrometrijom.

Oksidacijski reagens modificira se u skladu s prijedlozima navedenima pod (2) kako je opisano u priručniku proizvođača:

(a) 8,2 g $HgCl_2$ i 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ otapaju se u nekoliko stotina mililitara vode s niskom koncentracijom ugljika kao reagensa;

(b) 20 g $K_2S_2O_8$ otapa se u otopini živine soli;

▼**M6**

(c) smjesi se dodaje 5 ml HNO_3 (konc.);

(d) reagens se razrjeđuje do 1 000 ml.

Interferencija klorida uklanja se upotrebom 40 µl volumena uzorka za deset posto klorida i 200 µl volumena uzorka za 1,9 posto klorida. Uzorci s visokim koncentracijama klorida i/ili veliki volumeni uzoraka mogu se analizirati u skladu s navedenom metodom pod uvjetom da se spriječi stvaranje klorida u oksidacijskoj posudi. Nakon toga po potrebi se može odrediti hlapljivi organski ugljik za predmetnu vrstu uzorka može.

LITERATURA

(1) ISO, Kvaliteta vode – utvrđivanje ukupnog organskog ugljika. Nacrt međunarodne norme ISO/DIS 8245, 16. siječnja 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Preporučuje se i (opisan je autoanalizator):

(3) Schreurs, W. (1978.) An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137. – 142.

▼M6

Dodatak 2.

Biorazgradnja u morskoj vodi

METODA PROTRESANJEM U TIKVICI

OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

1. **LABORATORIJ:**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA:**

3. **ISPITIVANA TVAR:**

Naziv:

Koncentracija radne otopine: mg/l kao tvar

Početna koncentracija u mediju, t_o: mg/l kao tvar

mg DOC/l

4. **MORSKA VODA:**

Izvor:

Datum skupljanja:

Dubina skupljanja:

Izgled u trenutku skupljanja (npr. zamućenost itd.):

Salinitet u trenutku skupljanja: ‰

Temperatura u trenutku skupljanja: °C

DOC „x” sati nakon skupljanja: mg/l

Prethodna obrada prije ispitivanja (npr. filtracija, taloženje, starenje itd.):

Broj kolonija mikroba — izvorni uzorak: kolonije/ml

— na početku ispitivanja: kolonije/ml

Druga svojstva:

5. **ODREĐIVANJA UGLJIKA:**

Analizator ugljika:

	Tikvica br.		DOC nakon n dana (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ispitivanje: morska voda ojačana nutrijentima s ispitivanom tvari	1	a_1					
		a_2					
		srednja vrijednost, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		srednja vrijednost, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Tikvica br.		DOC nakon n dana (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slijepa proba: morska voda ojačana nutrijentima bez ispitivane tvari	1	c_1					
		c_2					
		srednja vrijednost, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		srednja vrijednost, $C_{d(t)}$					
	srednja vrijednost, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOVANJE SIROVIH PODATAKA:**

Tikvica br.	Izračun rezultata	% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Srednja vrijednost (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Za D_1 i D_2 nije potrebno izračunati prosječnu vrijednost ako postoji znatna razlika.

Napomena: Slični se obrasci mogu upotrijebiti kada nakon razgradnje slijedi specifična analiza i za referentnu tvar te kontrole toksičnosti.

7. **ABIOTIČKA RAZGRADNJA (po izboru)**

	Vrijeme (dani)	
	0	t
DOC (mg/l) u sterilnoj kontroli	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ abiotička\ razgradnja = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

Dodatak 3.

Izračun teoretske biokemijske potrošnje kisika

METODA ZATVORENIH BOCA

TPK tvari $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ molekularne mase MW izračunava se u skladu s:

$$TPK_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Tim se izračunom pokazuje da se C mineralizira u CO_2, H u H_2O, P u P_2O_5 i Na u Na_2O. Halogen se eliminira kao halogenovodik, a dušik kao amonijak.

Primjer:

glukoza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$TPK = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mgglukoze$$

Molekularne mase soli koje nisu soli alkalijskih metala izračunavaju se pod pretpostavkom da su soli hidrolizirane.

Za sumpor se pretpostavlja da oksidira u stanje + 6.

Primjer:

natrijev n-dodecilbenzensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$TPK = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mgtvari$$

U slučaju tvari koje sadržavaju dušik, dušik se može eliminirati kao amonijak, nitrit ili nitrat u skladu s različitim teoretskim biokemijskim potrošnjama kisika.

$$TPK_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$TPK_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

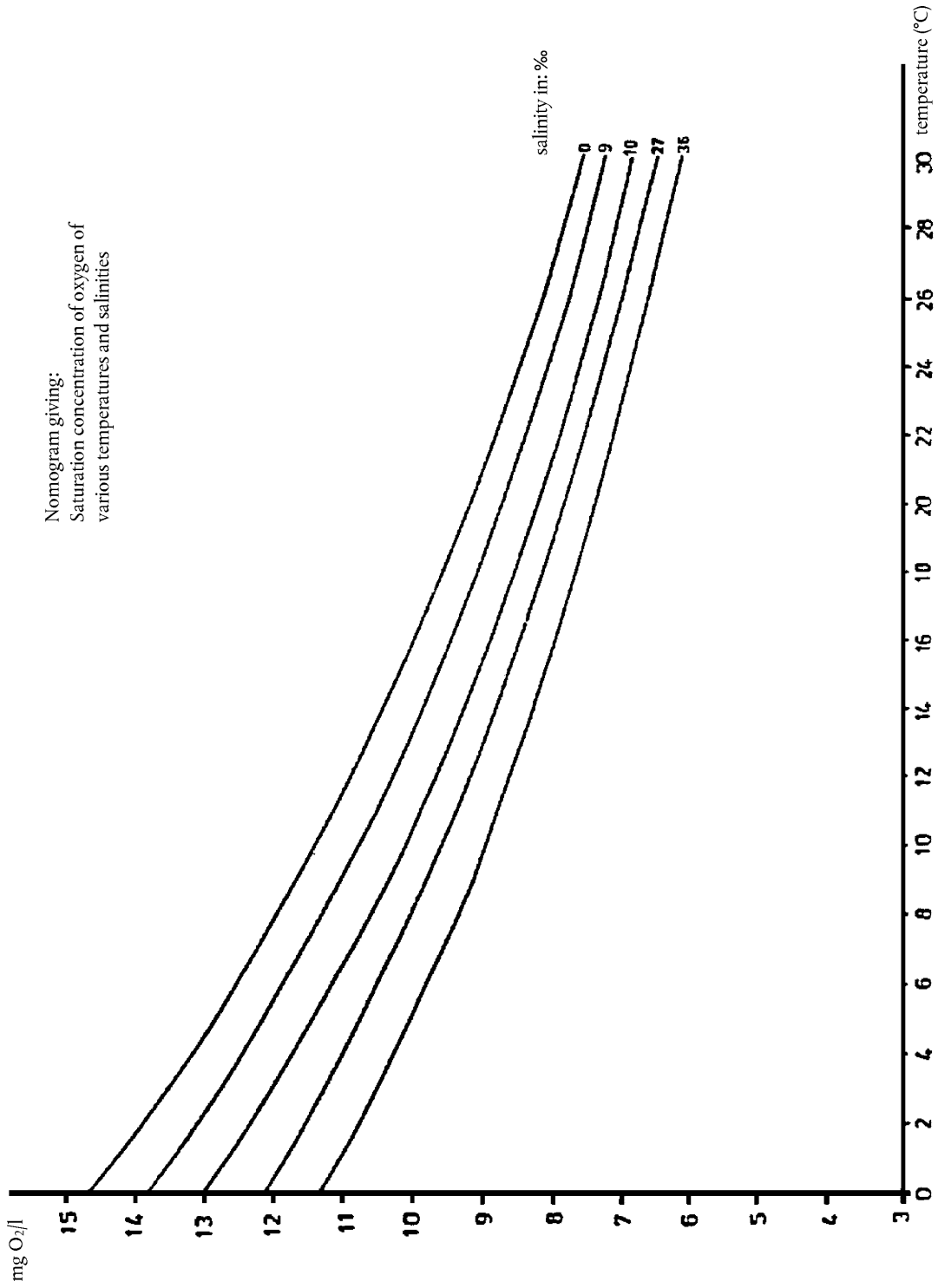
Pod pretpostavkom da je analizom opažena potpuna tvorba nitrata u slučaju sekundarnog amina:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$TPK_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mgtvari$$

▼**M6**

Dodatak 4.


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

▼M6

Dodatak 5.

Biorazgradnja u morskoj vodi

METODA ZATVORENIH BOCA

OBRAZAC ZA DOSTAVU PODATAKA

1. **LABORATORIJ:**

2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA:**

3. **ISPITIVANA TVAR:**

Naziv:

Koncentracija radne otopine:	mg/l
Početna koncentracija u morskoj vodi:	mg/l
TPK ili KPK:	mg O_2/mg ispitivane tvari

4. **MORSKA VODA:**

Izvor:

Datum skupljanja:

Dubina skupljanja:

Izgled u trenutku skupljanja (npr. zamućenost itd.):

Salinitet u trenutku skupljanja:	‰
Temperatura u trenutku skupljanja:	°C
DOC „x” sati nakon skupljanja:	mg/l

Prethodna obrada prije ispitivanja (npr. filtracija, taloženje, starenje itd.):

Broj kolonija mikroba	— izvorni uzorak:	kolonije/ml
	— na početku ispitivanja:	kolonije/ml

Druga svojstva:

5. **ISPITNI MEDIJ:**

Temperatura nakon dozračivanja:	°C
Koncentracija O_2 nakon dozračivanja i stanje prije početka ispitivanja:	mg O_2/l

6. **ODREĐIVANJE DO-A:**

Metoda: Winkler/elektroda

	Tikvica br.		mg O_2/l nakon n dana			
			0	5	15	28
Ispitivanje: morska voda ojačana nutrijentima s ispitivanom tvari	1	a_1				
	2	a_2				
	Srednja vrijednost u ispitivanju	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Tikvica br.		mg O_2/l nakon n dana			
			0	5	15	28
Slijepa proba: morska voda ojačana nutrijentima, ali bez ispitivane tvari	1	c_1				
	2	c_2				
	Srednja vrijednost u slijepoj probi	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Napomena: sličan se obrazac može upotrijebiti za referentnu tvar i kontrole toksičnosti.

7. **POTROŠNJA DO-A: % RAZGRADNJE (% D):**

	Potrošnja DO-a nakon n dana		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{ispitivana\ tvar(mg/l) \times TPK} \times 100$			

[1] Pretpostavlja se da je $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, pri čemu:
$m_{b(o)}$ = vrijednost u slijepoj probi 0. dana,
$m_{t(o)}$ = vrijednost ispitivane tvari 0. dana.
Ako $m_{b(o)}$ nije jednak $m_{t(o)}$, primjenjuje se $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, pri čemu:
$m_{b(x)}$ = vrijednost u slijepoj probi x. dana,
$m_{t(x)}$ = vrijednost ispitivane tvari x. dana.

▼M6

C.43. **ANAEROBNA BIORAZGRADIVOST ORGANSKIH TVARI U RAZGRAĐENOM MULJU: MJERENJEM PROIZVODNJE PLINA**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 311 (2006.). Postoje brojni testovi probira za procjenu aerobne biorazgradivosti organskih tvari (ispitne metode C.4., C.9., C.10. i C.11. (1) i Smjernica za ispitivanje OECD-a 302C (2)) i rezultati njihove primjene uspješno su upotrijebljeni za predviđanje sudbine tvari u aerobnom okolišu, osobito u aerobnim fazama pročišćavanja otpadnih voda. Različiti udjeli tvari topljivih u vodi, kao i onih koje adsorbiraju otpadne krute tvari, obrađuju se aerobno s obzirom na to da su one prisutne u istaloženim otpadnim vodama. Međutim, veće frakcije tih tvari povezane su s prvim istaloženim muljem, koji se odvaja od otpadne vode u primarnim taložnicama prije nego što se otpadne vode ili supernatant pročišćava aerobno. Mulj, koji sadržava neke topljive tvari u međuprostornoj tekućini, zatim se prenosi u grijane digestere za anaerobno pročišćavanje. Budući da još ne postoje ispitivanja iz ove serije kojima se procjenjuje anaerobna biorazgradivost u anaerobnim digesterima i da je svrha ovog ispitivanja popunjavanje te praznine, ono nije nužno primjenjivo na ostale anoksične dijelove okoliša.

2. Respirometrijske metode kojima se mjere količine proizvedenog plina, uglavnom metana (CH_4) i ugljikova dioksida (CO_2), u anaerobnim su uvjetima uspješno primijenjene za procjenu anaerobne biorazgradivosti. Birch *et al*. (3) revidirali su te postupke te zaključili da je rad autora Sheltona i Tiedjea (4), koji se temelji na ranijim ispitivanjima (5)(6)(7), bio najopsežniji. Metodom (4), koju su ostali autori dodatno razvili (8) i koja je postala američki standard (9), (19), nisu riješene teškoće povezane s različitim topljivostima spojeva CO_2 i CH_4 u ispitnom mediju te s izračunom teoretske proizvodnje plina ispitivane tvari. U izvješću ECETOC (3) preporučuju se dodatna mjerenja sadržaja otopljenog anorganskog ugljika (DIC) tekućeg supernatanta, što je ovu metodu učinilo široko primjenjivom. Metoda ECETOC bila je podvrgnuta međunarodnom kalibracijskom testiranju (ili prstenastom testu) te je postala norma ISO 11734 (11).

3. U ovoj ispitnoj metodi, koja se temelji na normi ISO 11734 (11), opisuje se metoda probira za ocjenjivanje potencijalne anaerobne biorazgradivosti organskih tvari u određenim uvjetima (tj. u anaerobnom digesteru u određenom trenutku i rasponu koncentracije mikroorganizama). Budući da se razrijeđeni mulj upotrebljava s relativno visokom koncentracijom ispitivane tvari te da je trajanje testa uobičajeno dulje od vremena zadržavanja u anaerobnim digesterima, uvjeti ispitivanja ne odgovaraju nužno uvjetima u anaerobnim digesterima i ono nije primjenjivo na procjenu anaerobne biorazgradivosti organskih tvari u različitim okolišnim uvjetima. Mulj se izlaže ispitivanoj tvari u trajanju do 60 dana, što je dulje od uobičajenog vremena zadržavanja mulja (od 25 do 30 dana) u anaerobnim digesterima, iako vrijeme zadržavanja na industrijskim lokacijama može biti mnogo dulje. Procjene dobivene iz rezultata ovog ispitivanja ne mogu se provesti jednako uvjerljivo kao u slučaju aerobne biorazgradivosti jer dokazi o ponašanju ispitivanih tvari u „spremnim” aerobnim ispitivanjima i simulacijskim ispitivanjima i aerobnom okolišu dovoljni su da dokažu da postoji povezanost; za anaerobni okoliš postoji malo sličnih dokaza. Pretpostavlja se da do potpune anaerobne biorazgradivost može doći u slučaju 75 – 80 % teoretske proizvodnje plina. Visoki omjeri tvari u biomasi upotrijebljenoj u ovim ispitivanjima znače da tvar koja prođe ima veće šanse za razgradnju u anaerobnom digesteru. Osim toga, tvari koje se ne pretvore u plin tijekom

▼M6

ispitivanja možda se neće održati u okolišno realističnijim omjerima tvar: biomasa. Nadalje, događaju se ostale anaerobne reakcije u kojima se tvari mogu barem djelomično razgraditi, npr. uklanjanje klora, ali ovim ispitivanjem ne otkrivaju se takve reakcije. Međutim, primjenom specifičnih analitičkih metoda za određivanje ispitivane tvari može se pratiti njezino nestajanje (vidi odjeljke 6., 30., 44. i 53.).

NAČELO ISPITIVANJA

4. Isprani razgrađeni mulj ([1]), koji sadržava niske (< 10 mg/l) koncentracije anorganskog ugljika (engl. *inorganic carbon*, IC), razrijeđuje se deseterostruko do ukupne koncentracije krute tvari od 1 g/l do 3 g/l i inkubira na 35 °C ± 2 °C u zabrtvljenim posudama s ispitivanom tvari na od 20 do 100 mg C/l na razdoblje do 60 dana. Dopušta se mjerenje aktivnosti mulja izvođenjem paralelnih slijepih proba s inokulumom mulja u mediju, ali bez ispitivane tvari.

5. Mjeri se povećan tlak plinskog prostora u posudama koji je rezultat proizvodnje ugljikova dioksida i metana. Velika količina proizvedenog CO_2 otopit će se u tekućoj fazi ili će se pretvoriti u karbonat ili hidrogenkarbonat u ispitnim uvjetima. Taj anorganski ugljik mjeri se na kraju ispitivanja.

6. Količina ugljika (anorganski plus metan) koji nastaje biorazgradnjom ispitivane tvari izračunava se iz neto proizvodnje plina i neto stvaranja anorganskog ugljika u tekućem stanju u višku slijepih kontrolnih vrijednosti. Doseg biorazgradnje mjeri se na temelju ukupnog proizvedenog anorganskog ugljika i metana-C kao postotak izmjerene ili izračunane količine ugljika dodanog ispitivanoj tvari. Tijek biorazgradnje može se pratiti samo srednjim mjerenjima proizvodnje plina. Osim toga, primarna biorazgradnja može se odrediti specifičnim analizama na početku i na kraju ispitivanja.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

7. Trebali bi biti poznati čistoća, topljivost u vodi, hlapljivost i adsorpcijska svojstva ispitivane tvari kako bi se omogućilo ispravno tumačenje rezultata. Sadržaj organskog ugljika (% w/w) ispitivane tvari mora biti poznat iz njezine kemijske strukture ili mjerenja. Za hlapljive ispitivane tvari izmjerena ili izračunana konstanta Henryjeva zakona pomaže pri odlučivanju je li ispitivanje primjenjivo. Informacije o toksičnosti ispitivane tvari za anaerobne bakterije korisne su pri odabiru odgovarajuće ispitne koncentracije te za tumačenje rezultata koji pokazuju slabu biorazgradivost. Preporučuje se uključiti kontrolu inhibicije, osim ako je poznato da ispitivana tvar ima inhibitorni učinak na anaerobne mikrobne aktivnosti (vidi stavak 21. i normu ISO 13641-1 (12)).

([1]) Razgrađeni mulj mješavina je stanja istaloženosti otpadnih voda i aktivnog mulja, koji su bili inkubirani u anaerobnom digesteru na oko 35 °C, u svrhu smanjenja teškoća povezanih s biomasom i mirisima te poboljšanja sposobnosti isušivanja iz mulja. Sastoji se od zajednice anaerobnih fermentativnih i metanogenih bakterija koje proizvode ugljikov dioksid i metan (11):

▼M6

PRIMJENJIVOST ISPITNE METODE

8. Ispitnu metodu moguće je primijeniti na tvari topljive u vodi; jednako tako, moguće ju je primijeniti na slabo topljive i netopljive tvari pod uvjetom da se upotrebljava metoda preciznog doziranja, npr. vidi normu ISO 10634 (13). Općenito govoreći, za hlapljive tvari potrebno je donijeti odluku za svaki slučaj zasebno. Možda je potrebno poduzeti posebne korake, primjerice ne ispuštati plin tijekom ispitivanja.

REFERENTNE TVARI

9. Za provjeru postupka referentna tvar ispituje se paralelnim postavljanjem odgovarajućih posuda kao dijelom uobičajenih ispitnih nizova. Primjeri su fenol, natrijev benzonat i polietilen glikol 400 i očekuje se da bi se mogli razgraditi proizvodnjom plina većom od 60 % (tj. metan i anorganski ugljik) unutar 60 dana (3)(14).

MJERNA OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITIVANJA

10. U međunarodnom prstenastom testu (14) postojalo je dobro ponovno ostvarivanje u mjerenjima tlaka plina između triju posuda. Relativna standardna devijacija (koeficijent varijacije, KV) uglavnom je bila ispod 20 %, iako se ova vrijednost često povećavala na > 20 % u prisutnosti toksičnih tvari ili prema kraju 60-dnevnog inkubacijskog razdoblja. Više devijacije pronađene su i u posudama zapremnine < 150 ml. Konačne pH-vrijednosti ispitnog medija bile su u rasponu 6,5 – 7,0.

11. Sljedeći rezultati dobiveni su prstenastim ispitivanjem.

Ispitivana tvar	Ukupni podaci n_1	Srednja razgradnja (ukupnih podataka) (%)	Relativno standardno odstupanje (ukupnih podataka) (%)	Valjani podaci n2	Srednja razgradnja (valjanih podataka) (%)	Relativno standardno odstupanje (valjanih podataka) (%)	Podaci > 60 % Razgradnje u valjanim ispitivanjima n_3
Palmitinska kiselina	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Udjel n_2

12. Koeficijenti varijacije sredine svih vrijednosti dobivenih s palmitinskom kiselinom i polietilen glikolom 400 iznosili su 45 % (n = 36), odnosno 35 % (n = 38). Kada su izostavljene vrijednosti < 40 % i > 100 % (za prvo se pretpostavlja da je zbog niže od optimalnih uvjeta, a za potonje zbog nepoznatih razloga), KV-ovi su smanjeni na 26 %, odnosno na 23 %. Udjeli „valjanih" vrijednosti koje su ostvarile barem 60 % razgradnje iznosile su 70 % za palmitinsku kiselinu i 83 % za polietilen glikol 400. Udjeli postotka biorazgradnje dobivene iz mjerenja otopljenog anorganskog ugljika bile su relativno niske, ali varijabilne. Za palmitinsku kiselinu raspon je bio 0 – 35 %, srednji 12 % s KV-om 92 % te za polietilen glikol 400 0 – 40 %, srednji 24 %, s KV-om od 54 %.

OPIS ISPITNE METODE

Aparatura

13. Potrebna je uobičajena laboratorijska oprema te sljedeće:

a. inkubator – otporan na iskre i kontroliran na 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. staklene posude otporne na tlak odgovarajuće nominalne veličine ([1]), od kojih je svaka opremljena plinonepropusnim septumom koji može podnijeti tlak oko 2 bar. Zapremnina plinskog prostora trebala bi iznositi oko 10 do 30 % ukupne zapremnine. Ako se bioplin redovno otpušta, prikladno je oko 10 % plinskog prostora, ali ako se plin otpušta samo na kraju, prikladno je 30 %. Prilikom otpuštanja tlaka i pri svakom mjerenju uzorkovanja preporučuju se staklene serum boce, nominalne vrijednosti 125 ml, ukupne zapremnine oko 160 ml, zabrtvljene serum septumima ([2]) i uvijenim aluminijskim prstenovima;

c. uređaj za mjerenje tlaka ([3]) prilagođen za omogućivanje mjerenja i propuhivanja proizvedenog plina, primjerice ručni precizni mjerač tlaka spojen na odgovarajuću špricu s iglom; trostruki plinonepropusni ventil olakšava otpuštanje viška tlaka (Dodatak 1.). Interni volumen cijevi za mjerenje tlaka i ventila potrebno je održavati što nižim tako da pogreške koje nastale zanemarivanjem volumena opreme budu neznatne;

Napomena – Očitavanja tlaka upotrebljavaju se izravno za izračunavanje količine proizvedenog ugljika u plinskom prostoru (stavci od 42. do 44.). Druga je mogućnost da se očitavanja tlaka pretvore u volumene (na 35 °C, atmosferski tlak) proizvedenog plina s pomoću grafikona konverzije. Ovaj je grafikon sačinjen od podataka dobivenih injektiranjem poznatih volumena dušikova plina u niz ispitnih posuda (npr. serum boce) na temperaturi od 35 ° +/– 2 °C i bilježenjem rezultata stabiliziranih očitavanja tlaka (vidi Dodatak 2.). Izračun je prikazan u Napomeni u stavku 44.

Upozorenje – Pazite da se ne ozlijedite iglom tijekom upotreba mikrošprica.

d. analizator ugljika, prikladan za izravno određivanje anorganskog ugljika u rasponu od 1 mg/l do 200 mg/l;

e. šprice velike preciznosti za uzorke plina i tekućine;

f. magnetske miješalice i uređaji za praćenje (fakultativno);

g. komora za rukovanje s rukavicama (preporučuje se).

Reagensi

14. Tijekom cijelog ispitivanja upotrebljavajte reagense analitičke čistoće.

([1]) Preporučena je veličina od 0,1 litre do jedne litre.

([2]) Preporučuje se upotreba plinonepropusnih silikonskih septuma. Nadalje, preporučuje se da se ispita plinonepropusnost čepova, a osobito septuma od butilne gume, s obzirom na to da nekolicina komercijalni dostupnih septuma nije dovoljno plinonepropusna na metan te da neki septumi ne ostaju nepropusni u slučaju da ih se probuši iglom u ispitnim uvjetima.

([3]) Uređaj je potrebno upotrebljavati i kalibrirati redovno, u skladu s proizvođačevim uputama. Ako se upotrebljava mjerač tlaka propisane kakvoće, npr. zaplombiran s čeličnom membranom, nije potrebna kalibracija u laboratoriju. Preciznost kalibracije može se provjeriti u laboratoriju mjerenjem u jednoj točki na 1 x 10^5 Pa mjeračem tlaka s mehaničkim zaslonom. Kada je ova točka precizno izmjerena, i linearnost ostaje nepromijenjena. Ako se upotrebljavaju ostali mjerni uređaji (bez potvrđene proizvođačeve kalibracije), preporučuje se redovna kalibracija cjelokupnog raspona.

▼M6

Voda

15. Destilirana ili deionizirana voda (deoksigenirana propuhivanjem s dušikovim plinom koji sadržava manje od 5 µl/l kisika) koja sadržava manje od 2 mg/l otopljenog organskog ugljika (DOC).

Ispitni medij

16. Pripremite medij za razrjeđivanje da sadržava sljedeće sastojke u navedenim količinama;

Anhidridan kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatrijev monohidrogen ortofosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Amonijakov klorid (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Željezov (II) klorid tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (indikator kisika)	0,001g
Natrijev sulfid nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Radna otopina elemenata u tragovima (fakultativno, stavak 18.)	10 ml
Dodati deoksigeniranu vodu (stavak 15.)	jednoj litri

Napomena: Svježe isporučen natrijev sulfid trebao bi biti upotrijebljen ili ispran i osušen prije upotrebe kako bi se postigao redukcijski kapacitet. Ispitivanje se može provesti bez upotrebe komore za rukovanje s rukavicama (vidi stavak 26.). U tom slučaju konačna koncentracija natrijeva sulfida u mediju trebala bi se povećati do 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ po litri. Natrijev sulfid moguće je dodati i iz odgovarajuće anaerobne radne otopine kroz septum zatvorenih ispitnih posuda jer će se tim postupkom smanjiti rizik od oksidacije. Natrijev sulfid moguće je zamijeniti titanovim (III) citratom, koji se dodaje kroz septum zatvorenih ispitnih posuda u konačnoj koncentraciji od 0,8 do 1,0 mmol/l. Titanov (III) citrat visoko je učinkovito redukcijsko sredstvo niske toksičnosti, koje se priprema na sljedeći način: Otopite 2,94 g trinatrijeva citrat dihidrata u 50 ml deoksigenirane vode (kako biste dobili otopinu od 200 mmol/l) i dodajte 5 ml 15 % (w/v) otopine titanova (III) klorida. Neutralizirajte do pH-vrijednosti 7 ± 0,2 s mineralnom lužinom i stavite u odgovarajuću posudu pod tok dušika. Koncentracija titanova (III) citrata u ovoj radnoj otopini iznosi 164 mmol/l.

17. Pomiješajte sastojke ispitnog medija, osim redukcijskog sredstva (natrijev sulfid titanov citrat) i propuhujte otopinu s dušikovim plinom na otprilike 20 minuta netom prije upotrebe kako biste uklonili kisik. Zatim dodajte odgovarajući volumen svježe pripravljene otopine redukcijskog sredstva (pripremljenog u deoksigeniranoj vodi) netom prije upotrebe medija. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost medija s razrijeđenom mineralnom kiselinom ili lužinom na 7 ± 0,2.

▼M6

Radna otopina elemenata u tragovima (fakultativno)

18. Preporučuje se da ispitni medij sadržava sljedeće elemente u tragovima radi poboljšanja postupaka anaerobne razgradnje, osobito ako se upotrebljavaju niske koncentracije (npr. 1 g/l) inokuluma (11).

Manganov klorid tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borna kiselina (H_3BO_3)	5 mg
Cinkov klorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Bakar (II) klorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatrijev molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobalt klorid tetrahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikal klorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatrijev selenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Dodati deoksigeniranu vodu (stavak 15.)	jednoj litri

Ispitivana tvar

19. Dodajte ispitivanu tvar kao radnu otopinu, suspenziju, emulziju ili izravno kao krutu ili tekuću tvar, ili absorbiranu na filtar od staklenih vlakana za dobivanje koncentracije ne veće od 100 ml/l organskog ugljika. Ako se upotrebljavaju radne otopine, pripravite prikladnu otopinu s vodom (stavak 15.) (prethodno deoksiginirana propuhivanjem s dušikovim plinom) čija je snaga tolika da dodani volumen bude manji od 5 % ukupnog volumena reakcijske smjese. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost radne otopine na 7 ± 0,2. Za ispitivane tvari koje nisu dovoljno topljive u vodi konzultirajte normu ISO 10634 (13). Ako se upotrebljava otapalo, pripremite dodatnu kontrolu tako da otapalo dodate samo inokuliranog medija. Potrebno je izbjegavati organska otapala za koja se zna da inhibiraju proizvodnju metana, poput kloroforma i ugljikova tetraklorida.

Upozorenje – Oprezno rukujte toksičnim ispitivanim tvarima te tvarima s nepoznatim svojstvima.

Referentne tvari

20. Referentne tvari kao što su natrijev benzonat, fenol i polietilen glikol 400 uspješno su upotrijebljeni za provjeru postupka jer su biorazgrađeni za više od 60 % unutar 60 dana. Pripravite radnu otopinu (u deoksigeniranoj vodi) odabrane referentne tvari na isti način kao što ste pripravili ispitivanu tvar i prema potrebi prilagodite na pH-vrijednost 7 ± 0,2.

Kontrola inhibicije (uvjetovana)

21. Za dobivanje informacija o toksičnosti ispitivane tvari za anaerobne mikroorganizme u svrhu postizanja najprikladnije ispitne koncentracije, dodajte ispitivanu tvar i referentnu tvar posudi s ispitnim medijem (vidi stavak 16.), odnosno svaku u istoj koncentraciji kako je dodano (vidi stavke 19. i 20. i vidi normu ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Razgrađeni mulj

22. Prikupite razgrađeni mulj iz digestera na postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda na kojem se pretežno pročišćava komunalni otpad. Mulj je potrebno potpuno opisati te izvijestiti o pozadinskim informacijama (vidi stavak 15.). Ako se namjerava upotrijebiti prilagođeni inokulum, može se razmotriti upotreba razgrađenog mulja iz postrojenja za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda. Za prikupljanje razgrađenog mulja upotrijebite boce širokoga grla izrađene od polietilena visoke gustoće ili sličnog materijala koji se može proširiti. Dodajte mulj do unutar oko 1 cm vrha boca i čvrsto zabrtvite, po mogućnosti sigurnosnim ventilom. Nakon prijevoza u laboratorij prikupljeni mulj moguće je upotrebljavati izravno ili ga staviti u laboratorijski digester. Otpustite višak bioplina opreznim otvaranjem boca s muljem. Druga je mogućnost da se anaerobni mulj uzgojen u laboratoriju može upotrebljavati kao izvor inokuluma, ali spektar njegovih aktivnosti mogao bi biti oslabljen.

Upozorenje – Razgrađeni mulj proizvodi zapaljive plinove koji predstavljaju rizik od požara i eksplozije: sadržava i potencijalno patogene organizme, stoga poduzmite odgovarajuće mjere opreza pri rukovanju muljem. Zbog sigurnosnih razloga tijekom prikupljanja mulja ne upotrebljavajte staklene posude.

23. Kako bi se smanjila proizvodnja pozadinskog plina i kako bi se smanjio utjecaj slijepih proba, može se razmotriti mogućnost prethodne razgradnje mulja. Ako je potrebno napraviti prethodnu razgradnju, potrebno je omogućiti da se mulj razgradi bez dodavanja ikakvih nutrijenata ili supstrata na 35 °C ± 2 °C na razdoblje do sedam dana. Dokazano je da se prethodnom razgradnjom u trajanju od otprilike pet dana uobičajeno dobiva optimalno smanjenje proizvodnje plina u slijepoj probi bez neprihvatljivih povećanja razdoblja prilagodbe ili inkubacije tijekom ispitne faze ili gubitka aktivnosti prema malom broju ispitivanih tvari.

24. Za slabo razgradive ispitivane tvari ili za one tvari za koje se očekuje da će biti slabo razgradive, razmotrite prethodno izlaganje mulja ispitivanoj tvari kako biste dobili bolje prilagođen inokulum. U tom slučaju dodajte ispitivanu tvar u koncentraciji organskog ugljika od 5 ml/l do 20 mg/l razgrađenom mulju i inkubiranom u razdoblju do dva tjedna. Pažljivo isperite prethodno izložen mulj prije upotrebe (vidi stavak 25.) i u izvješću o ispitivanju naznačite uvjete prethodnog izlaganja.

Inokulum

25. Isperite mulj (vidi stavke od 22. do 24.) netom prije upotrebe kako biste smanjili koncentraciju anorganskog ugljika na ispod 10 mg/l u završnoj ispitnoj suspenziji. Centrifugirajte mulj u zabrtvljenim cijevima (npr. 3 000 g tijekom 5 min) i ispustite supernatant. Suspendirajte dobiveni talog u deoksigeniranom mediju (stavci 16. i 17.), ponovno centrifugirajte suspenziju i ispustite tekući supernatant. Ako se anorganski ugljik nije uspješno spustio, postupak ispiranja mulja moguće je ponoviti najviše dva puta. Čini se da to ne utječe štetno na mikroorganizme. Konačno, suspendirajte talog u potrebnoj količini ispitnog medija i odredite ukupnu koncentraciju krutih tvari [npr. ISO 11923 (15)]. Konačna ukupna koncentracija krutih tvari u posudama trebala bi biti u rasponu od 1 g/l do 3 g/l (ili oko 10 % toga u nerazrijeđenom razgrađenom mulju). Poduzmite sve prethodno navedene radnje tako da mulj bude u najmanjem doticaju s kisikom (npr. upotrijebite dušikovu atmosferu).

▼M6

POSTUPAK ISPITIVANJA

26. Provedite sljedeće početne postupke koristeći se tehnikama kojima će doticaj između razgrađenog mulja i kisika ostati što je niže izvedivo, na primjer, možda će biti potrebno raditi u komori za rukovanje s rukavicama u atmosferi dušika i/ili pročistiti boce s dušikom (4).

Priprema ispitnih i kontrolnih analiza

27. Pripremite barem tri ispitne posude (vidi stavak 13.b) za ispitivanu tvar, slijepe probe, referentnu tvar, kontrole inhibicijom (uvjetovane) i posude za kontrolu tlaka (fakultativni postupak) (vidi stavke 7. i od 19. do 21.). Mogu biti pripremljene i dodatne posude za procjenu primarne biorazgradnje s pomoću specifičnih analiza ispitivane tvari. Isti skup slijepih proba može se upotrebljavati za nekoliko ispitivanih tvari u istom ispitivanju dokle god su volumeni plinskog prostora dosljedni.

28. Pripremite razrijeđeni inokulum prije dodavanja posudama primjerice s pomoću pipete sa širokim otvorom. Dodajte alikvote dobro izmiješanog inokuluma (stavak 25.) tako da ukupna koncentracija krutih tvari bude jednaka u svim posudama (između 1 g/l i 3 g/l). Prema potrebi dodajte radne otopine ispitivanoj i referentnoj tvari nakon prilagodbe na pH-vrijednost 7 ± 0,2. Ispitivanu tvar i referentnu tvar potrebno je dodati najprikladnijim načinom primjene (stavak 19.).

29. Ispitna koncentracija organskog ugljika trebala bi uobičajeno iznositi između 20 i 100 mg/l (stavak 4.). Ako je ispitivana tvar toksična, ispitna koncentracija trebala bi biti smanjena na 20 mg/l ili čak i manje ako će se mjeriti samo primarna biorazgradnja specifičnim analizama. Potrebno je napomenuti da se varijabilnost rezultata ispitivanja povećava na nižim ispitnim koncentracijama.

30. Za posude sa slijepim probama dodajte istovjetnu količinu nosača koji se upotrebljava za doziranje ispitivane tvari umjesto radne otopine, suspenzije ili emulzije. Ako je ispitivana tvar bila dodana s pomoću filtara od staklenih vlakana ili organskih otapala, slijepim probama dodajte filtar ili istovjetnu količinu otapala koje je isparilo. Pripremite dodatno ponovljeno višestruko određivanje s ispitivanom tvari za mjerenje pH-vrijednosti. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost na 7 ± 0.2, s malim količinama razrijeđene mineralne kiseline ili lužine. Potrebno je dodati iste količine sredstava za neutralizaciju svim ispitnim posudama. Ta dodavanja nije bilo potrebno provesti jer je pH-vrijednost radnih otopina ispitivanih tvari i referentne tvari već bila prilagođena (vidi stavke 19. i 20.). Ako će se mjeriti primarna biorazgradnja, potrebno je uzeti odgovarajući uzorak iz posude za kontrolu pH-vrijednosti ili iz dodatne ispitne posude i koncentracija ispitivane tvari trebala bi se mjeriti s pomoću specifičnih analiza. Svim je posudama moguće dodati pokrivene magnete ako treba izmiješati reakcijsku smjesu (fakultativno).

31. Pobrinite se da su ukupna količina tekućine V_l i volumen plinskog prostora V_h isti u svim posudama; zabilježite vrijednosti od V_l i V_h. Svaka posuda trebala bi biti zabrtvljena plinskim septumom i premještena iz komore za upravljanje s rukavicama (vidi stavak 26.) u inkubator (vidi stavak 13.a).

▼M6

Netopljive ispitivane tvari

32. Dodajte odvagane količine tvari koje su slabo topljive u vodi izravno u pripremljene posude. Kada je potrebna upotreba otapala (vidi stavak 19.), premjestite tekućinu ispitivane tvari u prazne posude. Kad je moguće, isparite otapalo puštanjem dušikova plina kroz posude i zatim dodajte ostale sastojke, odnosno razrijeđeni mulj (stavak 25.) i deoksigeniranu vodu prema potrebi. Potrebno je pripremiti i dodatnu kontrolnu skupinu s otapalom (vidi stavak 19.). Za ostale metode dodavanja netopljivih tvari može se konzultirati normu ISO 10634 (13). Tekuće ispitivane tvari mogu se dozirati s pomoću šprice u potpuno pripremljene zabrtvljene posude ako je očekivano da početna pH-vrijednost neće prijeći 7 ± 1, u tom slučaju dozirajte kako je prethodno opisano (vidi stavak 19.).

Inkubacija i mjerenja tlaka plina

33. Inkubirajte pripremljene posude na 35 °C ± 2 °C na otprilike sat vremena kako biste omogućili izjednačavanje i otpuštanje viška plina u atmosferu, primjerice naizmjeničnim protresanjem svake posude, umetanjem igle mjerača tlaka (stavak 13-c) kroz čep i otvaranjem ventila dok mjerač tlaka ne očita nulu. Ako je u ovoj fazi ili pri srednjim mjerenjima tlak plinskog prostora niži od atmosferskoga, potrebno je uvesti dušikov plin za ponovnu uspostavu atmosferskog tlaka. Zatvorite ventil (vidi stavak 13-c) i nastavite s inkubacijom u mraku te se pobrinite da svi se dijelovi posuda održavaju na temperaturi razgradnje. Promatrajte posude nakon inkubacije od 24 do 48 sati. Odbacite one posude čiji sadržaj ima jasnu ružičastu boju u tekućem supernatantu, tj. ako je resazurin (vidi stavak 16.) promijenio boju, čime se naznačuje prisutnost kisika (vidi stavak 50.). Manje količine kisika u sustavu mogu se tolerirati, ali više koncentracije mogu ozbiljno inhibirati tijek anaerobne biorazgradnje. Odbacivanje pojedinačnih posuda iz skupine od triju posuda može biti prihvatljivo, ali u slučaju da ih veći broj ne valja, potrebno je provesti istragu eksperimentalnih postupaka te ponoviti ispitivanje.

34. Pažljivo pomiješajte sadržaj svake posude miješanjem ili protresanjem nekoliko minuta barem dva do tri puta tjedno i netom prije svakog mjerenja tlaka. Mjerenjem se ponovno suspendira inokulum i osigurava se uravnoteženost plinova. Sva mjerenja tlaka potrebno je provoditi brzo s obzirom na to da bi posude mogle biti izložene snižavanju temperature, što može dovesti do lažnih očitavanja. Tijekom mjerenja tlaka cijelu je ispitnu posudu, uključujući plinski prostor, potrebno održavati na temperaturi razgradnje. Mjeri se tlak plina, primjerice umetanjem kroz septum šprice s iglom (stavak 13-c) povezanom s mjeračem tlaka. Potrebna je pažnja kako bi se spriječio ulazak vode u špricu s iglom; ako se to dogodi, potrebno je osušiti mokre dijelove i uvesti novu iglu. Tlak je potrebno mjeriti u milibarima (vidi stavak 42.). Tlak plina u posudama može se mjeriti s vremena na vrijeme, npr. tjedno i fakultativno, višak plina ispušta se u atmosferu. Druga je mogućnost da se tlak mjeri samo na kraju ispitivanja kako bi se odredila količina proizvedenog bioplina.

35. Preporučuje se da se provedu srednja očitavanja tlaka plina jer povećanje tlaka služi kao smjernica kada bi ispitivanje moglo završiti i omogućuje praćenje kinetike (vidi stavak 6.).

▼M6

36. Uobičajeno ispitivanje završite nakon razdoblja inkubacije od 60 dana, osim ako je krivulja biorazgradnje koja je dobivena iz mjerenja tlaka prije toga dosegla fazu platoa; riječ je o fazi u kojoj je dosegnuta maksimalna razgradnja i krivulja razgradnje je izravnana. Ako je vrijednost platoa manja od 60 %, tumačenje postaje problematično jer se naznačuje da je mineraliziran samo dio molekule ili da je napravljena pogreška. Na kraju uobičajenog razdoblja inkubacije plin se proizvodi, ali faza platoa očito nije dosegnuta, tada je potrebno razmotriti produljivanje ispitivanja kako bi se provjerilo hoće li plato (> 60 %) biti dosegnut.

Mjerenje anorganskog ugljika

37. Na kraju ispitivanja nakon posljednjeg mjerenja tlaka plina pustite mulj da se istaloži. Naizmjence otvorite svaku posudu i odmah uzmite uzorak za određivanje koncentracije (mg/l) anorganskog ugljika (IC) u suspenziji supernatanta. Nije potrebno primijeniti ni centrifugiranje ni filtriranje suspenzije supernatanta jer bi došlo do neprihvatljivog gubitka otopljenog ugljikova dioksida. Ako je suspenziju nemoguće analizirati ili uzorkovati, pohranite je u zabrtvljenu bočicu, bez plinskog prostora i ohlađenu na oko 4 °C na razdoblje do dva dana. Nakon mjerenja anorganskog ugljika izmjerite i zabilježite pH-vrijednost.

38. Druga je mogućnost da anorganski ugljik u supernatantu bude određen neizravno otpuštanjem razrijeđenog anorganskog ugljika kao ugljikova dioksida koji se može izmjeriti u plinskom prostoru. Slijedeći posljednje mjerenje tlaka plina, prilagodite tlak u svakoj posudi atmosferskom tlaku. Acidificirajte sadržaj svake posude na otprilike pH-vrijednost 1 dodavanjem koncentriranih mineralnih kiselina (npr. H_2SO_4) kroz septum zabrtvljenih posuda. Inkubirajte protresene posude na 35 °C ± 2 °C na otprilike 24 sata i mjerite tlak plina koji je nastao iz razvijenog ugljikova dioksida s pomoću mjerača tlaka.

39. Slično očitajte odgovarajuće slijepe probe, referentnu tvari i, ako su uključene, posude za kontrolu inhibicijom (vidi stavak 21.).

40. U nekim slučajevima, posebno ako se iste kontrolne posude upotrebljavaju za nekoliko ispitivanih tvari, mjerenja srednje koncentracije anorganskog ugljika u ispitnim i kontrolnim posudama potrebno je razmotriti prema potrebi. U tom slučaju potrebno je pripremiti dovoljan broj posuda za sva srednja mjerenja. U ovom postupku prednost se daje uzimanju uzoraka samo iz jedne posude. Potonje se može učiniti samo ako potrebna količina otopljenog anorganskog ugljika za analizu nije procijenjena visokom. Mjerenje otopljenog anorganskog ugljika potrebno je provesti nakon mjerenja tlaka plina bez otpuštanja viška plina kako je opisano u nastavku:

— uzmite što je moguće manju količinu uzoraka supernatanta špricom kroz septum bez otvaranja posuda i određen je otopljeni anorganski ugljik u uzorku;

— nakon uzimanja uzorka višak plina otpušta se ili ne otpušta;

— potrebno je uzeti u obzir činjenicu da čak i malo smanjenje u količini supernatanta (npr. oko 1 %) može dati znatno povećanje u volumenu plina plinskog prostora (V_h);

— jednadžbe (vidi stavak 44.) su ispravljene povećanjem V_h u jednadžbi 3 prema potrebi.

▼M6

Specifične analize

41. Ako će se odrediti primarna anaerobna razgradnja (vidi stavak 30.), uzmite odgovarajuću količinu uzorka za specifične analize na početku i na kraju ispitivanja iz posuda koje sadržavaju ispitivanu tvar. Ako je to napravljeno, imajte na umu da će volumeni plinskog prostora (V_h) i tekućine(V_l) biti promijenjeni i uzmite to u obzir pri izračunavanju rezultata proizvodnje plina. Druga je mogućnost da se uzorci uzmu za specifične analize iz dodatnih mješavina prethodno napravljenih u ovu svrhu (stavak 30.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

42. Zbog praktičnih razloga tlak plina mjeri se u milibarima (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), volumen u litrama i temperatura u stupnjevima Celzijevima.

Ugljik u plinskom prostoru

43. Budući da jedna molekula metana i jedna molekula ugljikova dioksida sadržavaju 12 g ugljika, masa ugljika u danom volumenu razvijenog plina može biti izražena kao:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Jednadžba [1]}$$

pri čemu je:

m = masa ugljika (mg) u danom volumenu razvijenog plina;

12 = relativna atomska masa ugljika;

n = broj molekula plina u danom volumenu.

Ako je neki drugi plin osim metana ili ugljikova dioksida (npr. N_2O) proizveden u znatnim količinama, formulu [1] potrebno je izmijeniti kako bi se opisala mogućnost učinaka proizvedenih plinova.

44. Iz plinskih zakona n je moguće izraziti kao:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Jednadžba [2]}$$

pri čemu je:

p = tlak plina (Pascali);

V = volumen plina (m^3);

R = molarna plinska konstanta [8,314 J/(mol K)];

T = temperatura inkubacije (Kelvini).

Kombiniranjem jednadžbi [1] i [2] i racionaliziranjem kako bi se omogućila proizvodnja plina slijepih roba:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Jednadžba [3]}$$

pri čemu je:

m_h = masa neto ugljika proizvedenog kao plina u plinskom prostoru (mg);

Dp = sredina razlike između početnog i završnog tlaka u ispitnim posudama minus odgovarajuća sredina u slijepim probama (milibari);

▼M6

V_h = volumen plinskog prostora u posudi (l);

0,1 = pretvaranje njutna/m^2 u milibare i m^3 u litre.

Jednadžbu [4] potrebno je upotrebljavati za uobičajenu temperaturu inkubacije od 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Jednadžba [4]}$$

Napomena: Izračunavanje alternativnog volumena. Očitavanja mjerača tlaka pretvaraju se u ml plina proizvedenog s pomoću standardne krivulje dobivene grafičkim prikazom volumena (ml) injektiranog u naspram očitavanja mjerača (Dodatak 2.). Broj molekula (n) plina u plinskom prostoru svake posude izračunava se dijeljenjem sveukupne proizvodnje plina (ml) s 25 286 ml/molekuli, što je volumen koji zauzima jedna molekula plina na 35 °C i standardnom atmosferskom tlaku. Budući da svaka molekula CH_4 i molekula CO_2 sadržava 12 g ugljika, količina ugljika (mg) u plinskom prostoru (m_h) dobiva se jednadžbom [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Jednadžba [5]}$$

Racionaliziranje kako bi se omogućila proizvodnja plina u slijepoj kontroli:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Jednadžba [6]}$$

pri čemu je:

m_h = masa neto ugljika proizvedenog u plinskom prostoru (mg);

DV = sredina razlike između volumena plina proizvedenog u plinskom prostoru u ispitnim posudama i posudama za kontrolnu slijepu probu;

25286 = volumen koji zauzima jedna molekula plina na 35 °C, jedna atmosfera.

45. Tijek biorazgradnje može se slijediti grafičkim prikazom ukupnog povećanja tlaka Dp (milibari) u ovisnosti o vremenu, prema potrebi. Iz ove krivulje odredite i zabilježite fazu prilagodbe (u danima). Faza prilagodbe jest vrijeme od početka ispitivanja do početka znatne razgradnje (za primjer vidi Dodatak 3.). Ako su srednji uzorci supernatanta uzeti i analizirani (vidi stavke 40., 46. i 47.), tada ukupni proizvedeni C (u plinu plus onaj u tekućini) može biti grafički prikazan umjesto samo sveukupnog tlaka.

Ugljik u tekućini

46. Količina metana u tekućini zanemaruje se jer je poznato da je njegova topljivost u vodi vrlo niska. Izračunajte masu anorganskog ugljika u tekućini ispitnih posuda s pomoću jednadžbe [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Jednadžba [7]}$$

pri čemu je:

m_l = masa anorganskog ugljika u tekućini (mg);

C_{net} = koncentracija anorganskog ugljika u ispitnim posudama minus koncentracija u kontrolnim posudama na kraju ispitivanja (mg/l);

V_h = volumen tekućine u posudi (l);

▼M6

Ukupni isplinjeni ugljik

47. Izračunajte ukupnu masu isplinjenog ugljika u posudi s pomoću jednadžbe [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Jednadžba [8]}$$

pri čemu je:

m_t = ukupna masa isplinjenog ugljika (mg);

m_h i m_l prethodno su definirani.

Ugljik ispitivane tvari

48. Izračunajte masu ugljika u ispitivanoj tvari dobivenu iz dodane ispitivane tvari s pomoću jednadžbe [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Jednadžba [9]}$$

pri čemu je:

m_v = masa ugljika ispitivane tvari (mg);

C_c = koncentracija ugljika ispitivane tvari u ispitnoj posudi (mg/l)

V_h = volumen tekućine u ispitnoj posudi (l).

Doseg biorazgradnje

49. Izračunajte postotak biorazgradnje iz plina iz plinskog prostora s pomoću jednadžbe [10] i ukupan postotak biorazgradnje s pomoću jednadžbe [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Jednadžba [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Jednadžba [11]}$$

pri čemu je:

D_h = biorazgradnja iz plina plinskog prostora (%);

D_t = ukupna biorazgradnja (%);

m_h, m_v i m_t prethodno su definirani.

Stupanj primarne biorazgradnje izračunava se iz (fakultativnih) mjerenja koncentracije ispitivane tvari na početku i kraju inkubacije s pomoću jednadžbe [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Jednadžba [12]}$$

pri čemu je:

D_p = primarna razgradnja ispitivane tvari (%);

S_i = početna koncentracija ispitivane tvari (mg/l);

S_e = koncentracija ispitivane tvari na kraju (mg/l).

Ako se metodom analize naznačuju znatne koncentracije ispitivane tvari u neizmijenjenom inokulumu anaerobnog mulja, upotrijebite jednadžbu [13]:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Jednadžba [13]}$$

pri čemu je:

$D_p^{\ 1}$ = ispravljena primarna razgradnja ispitivane tvari (%);

S_{ib} = početna „očita” koncentracija ispitivane tvari (mg/l);

S_{ib} = „očita” koncentracija ispitivane tvari u kontroli slijepim probama (mg/l);

Valjanost rezultata

50. Očitavanja tlaka potrebno je upotrebljavati samo iz posuda koje ne pokazuju ružičastu boju (vidi stavak 33.). Kontaminacija kisikom svodi se na najmanju mjeru upotrebom odgovarajućih anaerobnih tehnika rukovanja.

51. Potrebno je uzeti u obzir činjenicu da je ispitivanje valjano ako referentna tvar dosegne plato koji predstavlja više od 60 % biorazgradnje ([1]).

52. Ako je pH-vrijednost na kraju ispitivanja premašila raspon 7 ± 1 i dogodila se nedovoljna biorazgradnja, ponovite ispitivanje s povećanjem puferskog kapaciteta medija.

Inhibicija razgradnje

53. Proizvodnja plina u posudama koje sadržavaju i ispitivanu tvar i referentnu tvar trebala bi biti barem jednaka plinu u posudama koje sadržavaju samo referentnu tvar; u suprotnome naznačuje se inhibicija proizvodnje plina. U nekim slučajevima proizvodnja plina u posudama koje sadržavaju ispitivanu tvar bez referentne tvari bit će niža od proizvodnje u slijepim probama, naznačujući da je ispitivana tvar inhibitorna.

Izvješće o ispitivanju

54. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće informacije:

Ispitivana tvar:

— uobičajeni naziv, kemijski naziv, CAS broj, strukturna formula i relevantna fizikalno-kemijska svojstva;

— čistoća (nečistoće) ispitivane tvari.

Uvjeti ispitivanja:

— količine razrijeđene suspenzije iz digestera (V_l) i plinskog prostora (V_h) u posudi;

— opis ispitnih posuda, glavnih karakteristika mjerenja bioplina (npr. vrsta mjerača tlaka) i analizatora anorganskog ugljika;

— primjena ispitivane tvari i referentne tvari na sustav ispitivanja: upotrijebljena ispitna koncentracija i svaka upotreba otapala;

— detaljne informacije o upotrijebljenom inokulumu: naziv postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, opis izvora pročišćene vode (npr. radna temperatura, vrijeme zadržavanja mulja, pretežno komunalni itd.), koncentracija, sve informacije koje su potrebne kako bi se ovo potkrijepilo te svako prethodno čišćenje inokuluma (npr. prethodna razgradnja, prethodno izlaganje);

— temperatura inkubacije;

— broj određivanja.

([1]) Ovo je potrebno ponovno vrednovati ako su uključene adsorptivne ili netopljive referentne kemikalije.

▼**M6**

Rezultati:

— pH-vrijednost i vrijednosti anorganskog ugljika na kraju ispitivanja;

— koncentracija ispitivane tvari na početku i kraju ispitivanja ako je izvedeno specifično mjerenje;

— svi izmjereni podaci prikupljeni tijekom ispitivanja, slijepa proba, referentna tvar i posude za kontrolu inhibicijom, prema potrebi (npr. tlak u milibarima, koncentracija anorganskog ugljika (mg/l) u tabličnom obliku (o izmjerenim podacima za plinski prostor i tekućinu potrebno je odvojeno obavijestiti);

— statistička obrada podataka, trajanje ispitivanja i dijagram biorazgradnje ispitivane tvari, referentne tvari i kontrola inhibicijom;

— postotak biorazgradnje ispitivane tvari i referentne tvari;

— obrazloženje odbijanja rezultata ispitivanja;

— rasprava o rezultatima.

LITERATURA

(1) Sljedeća poglavlja ovog Priloga:

C.4. Određivanje „lake” biorazgradivosti;

C.9. Biorazgradnja – Zahn-Wellensov test;

C.10. Biorazgradnja – Simulacijski testovi s aktivnim muljem:

A: Jedinice s aktivnim muljem, B: Biofilmovi;

C.11. Aktivni mulj, test inhibicije disanja (oksidacija ugljika i amonijaka).

(2) OECD (2009.) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Pariz

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989.) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527. – 1550. (Objavljeno i kao dokument ECETOC Technical Report No. 28, lipanj 1988.).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984.) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850. – 857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979.) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485. – 492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979.) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84. – 89.

(7) Gledhill, W.E. (1979.) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Radni dokument. 2. nacrt br. 35.24. Američko društvo za ispitivanje materijala, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988.) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441. – 2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼M6

(10) US-EPA (1998.) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Međunarodna organizacija za normizaciju (1995.) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) Međunarodna organizacija za normizaciju (2003.) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) Međunarodna organizacija za normizaciju (1995.) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

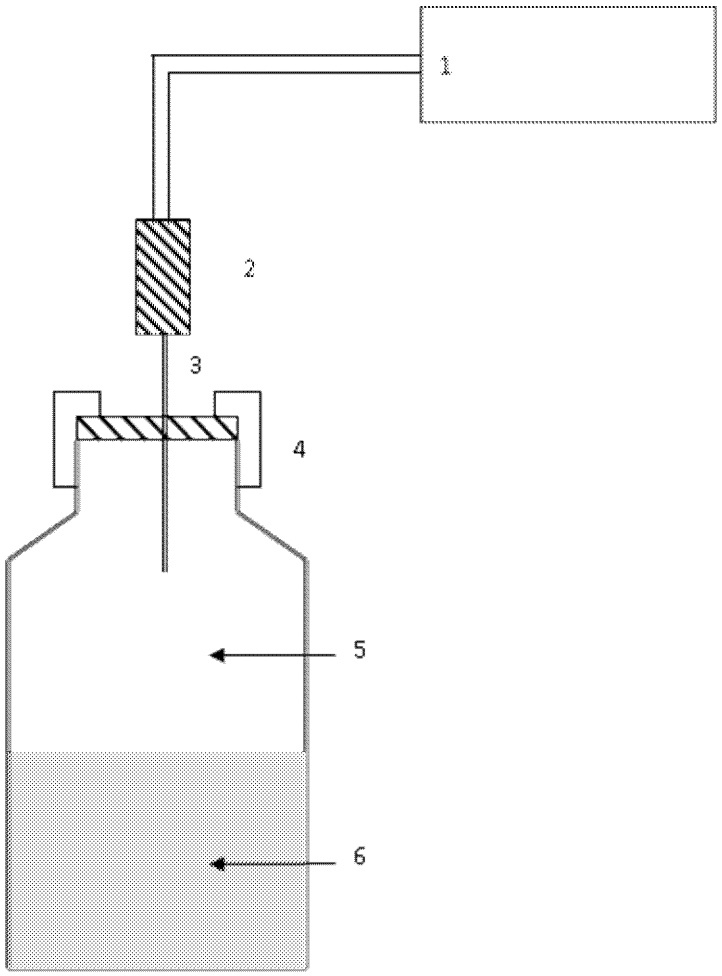
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993.) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499. – 1509.

(15) Međunarodna organizacija za normizaciju (1997.) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatak 1.

Primjer uređaja za mjerenje proizvodnje bioplina tlakom plina



Legenda:

1 – Mjerač tlaka

2 – Trostruki plinonepropusni ventil

3 – Šprica s iglom

4 – Plinonepropusna brtva (uvijeni čep i septum)

5 – Plinski prostor (V_h)

6 – Inokulum razgrađenog mulja (V_l)

Ispitne posude u okolišu na 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatak 2.

Pretvaranje mjerača tlaka

Očitavanja mjerača tlaka mogu biti povezana s volumenima plina putem standardne krivulje koja nastaje injektiranjem poznatih količina zraka na 35 °C ± 2 °C u serum boce koje sadržavaju količinu vode jednaku količini reakcijske smjese, V_R:

— Stavite V_R ml alikvota vode, čuvanih na 35 °C ± 2 °C u pet serum boca. Zabrtvite boce i stavite ih u vodenu kupku na 35 °C na jedan sat kako bi se izjednačile;

— Uključite mjerač tlaka, pričekajte da se stabilizira i prilagodite na nulu;

— Umetnite špricu s iglom kroz brtvu jedne od boca, otvorite ventil dok mjerač tlaka ne očita nulu te zatvorite ventil;

— Ponovite postupak s preostalim bocama;

— Injektirajte 1 ml zraka na 35 °C ± 2 °C u svaku bocu. Umetnite iglu (na mjeraču) kroz brtvu jedne od boca i pričekajte da se očitavanje tlaka stabilizira. Zabilježite tlak, otvorite ventil dok mjerač tlaka ne očita nulu i zatim zatvorite ventil;

— Ponovite postupak s preostalim bocama;

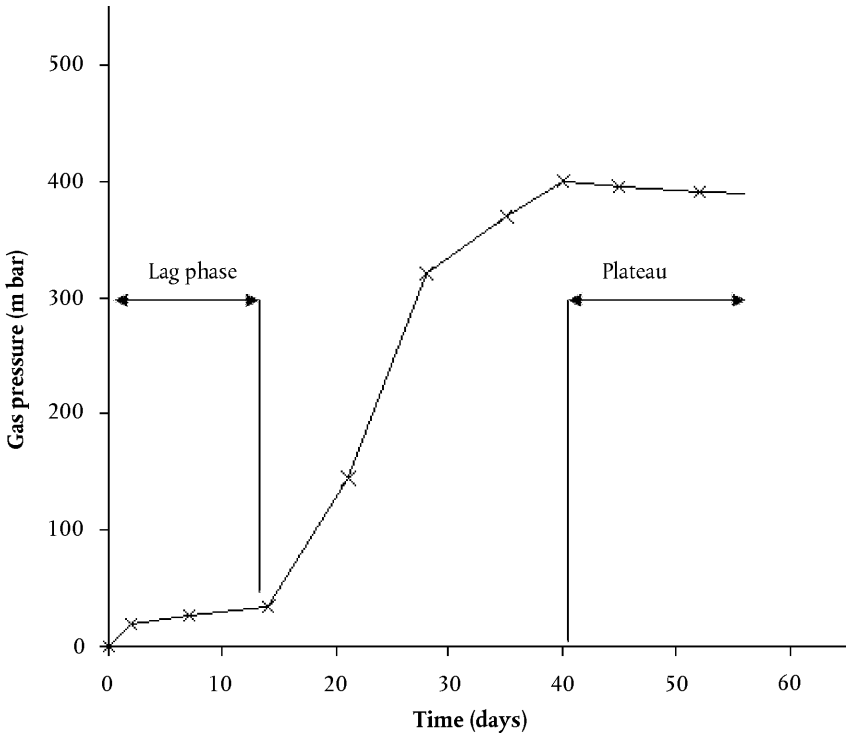
— Ponovite u potpunosti prethodni postupak s pomoću 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml zraka;

— Grafički prikažite krivulju tlaka (Pa) naspram injektiranog volumena plina Vb (ml). Odgovor instrumenta jest linearan u rasponu od 0 Pa do 70 000 Pa i od 0 ml do 50 ml proizvodnje plina.

▼**M6**

Dodatak 3.

Primjer krivulje razgradnje (sveukupno neto povećanje tlaka)



▼M6

Dodatak 4.

Primjer obrasca za ispitivanje anaerobne biorazgradnje – Obrazac za ispitivanu tvar

Laboratorij: ..... Ispitivana tvar: ..... Ispitivanje br.: .....

Temperatura ispitivanja:(°C): ..... Volumen plinskog prostora (V_h): .....(l) Volumen tekućine (V_l): .....(l)

Ugljik u ispitivanoj tvari $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Dan	p_1 (ispitivana tvar) (mbar)	p_2 (ispitivana tvar) (mbar)	p_3 (ispitivana tvar) (mbar)	p (ispitivana tvar) srednja vrijednost (mbar)	p_4 (slijepa proba) (mbar)	p_5 (slijepa proba) (mbar)	p_6 (slijepa proba) (mbar)	p (slijepa proba) srednja vrijednost (mbar)	p (neto) ispitivana tvar – slijepa proba srednja vrijednost (mbar)	Δp (neto) Sveukupno (mbar)	m_h plinski prostor C ([2]) (mg)	D_h Biorazgradnja ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ispitivana tvar (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ispitivana tvar (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ispitivana tvar (mg)	C_{IC} srednja vrijednost ispitivane tvari (mg)	$C_{IC,\ 4}$ slijepa proba (mg)	$C_{IC,\ 5}$ slijepa proba (mg)	$C_{IC,\ 6}$ slijepa proba (mg)	C_{IC} srednja vrijednost slijepe probe (mg)	$C_{IC,\ net}$ ispitivana tvar – slijepa proba srednja vrijednost (mg)	m_l tekućina C ([4]) (mg)	m_t ukupno C ([5]) (mg)	D_t Biorazgradnja ([6]) (%)
Anorganski ugljik (kraj)												
pH-vrijednost (kraj)												

([1]) Ugljik u ispitnoj posudi, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Ugljik u plinskom prostoru, m_h (mg) na normalnoj temperaturi inkubacije (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

([3]) Biorazgradnja izračunana iz plina plinskog prostora, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Ugljik u tekućini m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Ukupan isplinjeni ugljik, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Ukupna biorazgradnja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

Laboratorij: ..... Referentna tvar: ..... Ispitivanje br.: .....

Temperatura ispitivanja:(°C): ..... Volumen plinskog prostora (V_h): .....(l) Volumen tekućine (V_l) (u litrama): .....

Ugljik u referentnoj tvari $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg): …

Dan	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) srednja vrijednost (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) srednja vrijednost (mbar)	p (ref.) ref. – slijepa proba (mbar)	Δp (ref.) sveukupno (mbar)	m_h plinski prostor C ([2]) (mg)	D_h Biorazgradnja ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} ref. srednja vrijednost (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. srednja vrijednost (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. – inhib. (mg)	m_l tekućina C ([4]) (mg)	m_t ukupno C ([5]) (mg)	D_t Biorazgradnja ([6]) (%)
Anorganski ugljik (kraj)												
pH-vrijednost (kraj)												

([1]) Ugljik u ispitnoj posudi, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Ugljik u plinskom prostoru, m_h (mg) na normalnoj temperaturi inkubacije (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
([3]) Biorazgradnja izračunana iz plina plinskog prostora, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Ugljik u tekućini m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Ukupan isplinjeni ugljik, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Ukupna biorazgradnja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. ISPIRANJE U STUPCIMA TLA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 312 (2004.). Umjetne kemikalije mogu doći u doticaj s tlom izravno zahvaljujući namjernoj primjeni (primjerice agrokemikalije) ili neizravnim putevima (primjerice, otpadna voda → kanalizacijski mulj → tlo ili zrak → mokar/suh talog). Pri procjeni rizika tih kemikalija važno je procijeniti njihov potencijal za pretvorbu u tlu i za prodiranje (ispiranje) u dublje slojeve tla, a potom i u podzemne vode.

2. Dostupno je nekoliko metoda za mjerenje potencijala za ispiranje kemikalija u tlu u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, odnosno kromatografija tankog sloja tla, kromatografija debelog sloja tla, kromatografija stupca tla te mjerenja adsorpcije – desorpcije (1) (2). U slučaju neioniziranih kemikalija zahvaljujući podjelnom koeficijentu n–oktanol–voda (P_{ow}) moguća je rana procjena njihove adsorpcije i potencijala za ispiranje (3)(4)(5).

3. Ovdje opisana ispitna metoda temelji se na kromatografiji stupca tla u poremećenom tlu (za definiciju vidi Dodatak 1.). Provode se dvije vrate pokusa za utvrđivanje (i) potencijala za ispiranje ispitivane kemikalije te (ii) potencijala za ispiranje proizvoda pretvorbe (studija sa starim ostacima) u tlima u kontroliranim laboratorijskim uvjetima ([1]). Ispitna metoda temelji se na postojećim metodama (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Na radionici OECD-a o odabiru tala/sedimenata održanoj u talijanskom Belgiratu 1995. (12) dogovoreni su broj i vrste tla za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi. Iznesene su i preporuke za prikupljanje i skladištenje uzoraka tla te rukovanje njima za pokuse ispiranja.

NAČELO ISPITNE METODE

5. Stupci izrađeni od odgovarajuće inertnog materijala (primjerice stakla, nehrđajućeg čelika, aluminija, teflona, PVC-a itd.) pune se tlom i potom zasićuju i uravnotežuju otopinom „umjetne kiše” (za definiciju vidi Dodatak 1) te ostavljaju da se ocijede. Potom se površina svakog stupca tla tretira ispitivanom kemikalijom i/ili starim ostacima ispitivane kemikalije. Nakon toga u stupce tla dodaje se umjetna kiša i prikuplja se eluat. Nakon postupka ispiranja tlo se vadi iz stupaca i dijeli u odgovarajući broj segmenata ovisno o informacijama za potrebe studije. Svi segmenti tla i eluat potom se analiziraju na ispitivanu kemikaliju i, po potrebi, na proizvode pretvorbe ili ostale ispitivane kemikalije.

PRIMJENJIVOST ISPITNE METODE

6. Ispitna metoda može se primijeniti na ispitivane kemikalije (neobilježene i radioaktivno obilježene, primjerice ^{14}C) za koje postoji dovoljno točna i osjetljiva analitička metoda. Ispitnu metodu ne bi trebalo primjenjivati na kemikalije koje hlape iz tla i vode, odnosno ne ostaju u tlu i/ili eluatu u pokusnim uvjetima ove ispitne metode.

INFORMACIJE O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

7. Neobilježene i radioaktivno obilježene ispitivane kemikalije mogu se upotrijebiti za mjerenje ispiranja u stupcima tla. Radioaktivno obilježeni materijal potreban je za ispitivanje ispiranja proizvoda pretvorbe (starih ostataka ispitivane kemikalije) i za određivanja bilance mase. Preporučuje se označavanje

([1]) Iz sstudija ispiranja stupaca sredstava za zaštitu usjeva moguće je doći do informacija o pokretljivosti ispitivane kemikalije i njezinih proizvoda pretvorbe, a one mogu biti i dopuna studijama sorpcije.

▼M6

izotopom ^{14}C, ali korisni mogu biti i ostali izotopi, poput ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Oznaku je po mogućnosti potrebno staviti na najstabilniji dio odnosno dijelove molekule. Čistoća ispitivane kemikalije trebala bi biti najmanje 95 %.

8. Većinu je kemikalija potrebno primijeniti kao jedinstvenu tvar. Međutim, u slučaju aktivnih tvari u sredstvima za zaštitu bilja za ispitivanje ispiranja polazne ispitivane tvari mogu se upotrebljavati formulirani proizvodi, ali je njihovo ispitivanje posebno nužno u slučaju vjerojatnosti da smjesa utječe na stopu ispuštanja (primjerice granulirani ili kontrolirani pripravci koji se otpuštaju). Kad je riječ o posebnim zahtjevima za plan ispitivanja, prije provedbe korisno je savjetovanje s regulatornim tijelom. U studijama ispiranja ostatka potrebno je upotrebljavati čistu polaznu ispitivanu tvar.

9. Prije provedbe ispitivanja ispiranja u stupcima tla sljedeće bi informacije o ispitivanoj kemikaliji, trebale po mogućnosti biti raspoložive:

   (1) topljivost u vodi [ispitna metoda A.6.] (13);

   (2) topljivost u organskim otapalima;

   (3) tlak para [ispitna metoda A.4.] (13) i konstanta Henryjevog zakona;

   (4) podjelni koeficijent n-oktanol/voda [ispitne metode A.8. i A.24.] (13);

   (5) koeficijent adsorpcije (K_d, K_f or K_{OC}) [ispitne metode C.18. i/ili C.19.] (13);

   (6) hidroliza [ispitna metoda C.7.] (13);

   (7) konstanta disocijacije (pK_a) [smjernica OECD-a TG 112] (25);

   (8) aerobna i anaerobna pretvorba u tlu [ispitna metoda C.23.] (13)

   Napomena: U pripadajućim izvješćima o ispitivanju potrebno je navesti temperaturu na kojoj su provedena ta mjerenja.

10. Količina ispitivane kemikalije primijenjene na stupce tla trebala bi biti dovoljna za otkrivanje najmanje 0,5 % primijenjene doze u svim pojedinačnim segmentima. U slučaju aktivnih kemikalija u sredstvima za zaštitu bilja količina primijenjene ispitivane kemikalije može odgovarati maksimalnoj preporučenoj stopi upotrebe (jedna primjena).

11. Za kvantifikaciju ispitivane kemikalije i, po potrebi, njezinih proizvoda pretvorbe u tlu i eluatu mora biti raspoloživa odgovarajuća analitička metoda poznate točnosti, preciznosti i osjetljivosti. Trebala bi biti poznata i granica analitičke detekcije ispitivane kemikalije i njezinih važnih proizvoda pretvorbe (u pravilu najmanje svih proizvoda pretvorbe $\geq$ 10 % primijenjene doze uočene u studijama puta pretvorbe, ali, po mogućnosti, svih relevantnih ispitivanih proizvoda pretvorbe) (vidi stavak 17.).

▼M6

REFERENTNE KEMIKALIJE

12. Za procjenu relativne pokretljivosti ispitivane kemikalije u tlu potrebno je upotrebljavati referentne kemikalije poznatog ponašanja u smislu ispiranja, poput atrazina ili monurona čije se otpuštanje u području smatra umjerenim. Za potvrdu hidrodinamičkih svojstava stupca tla mogu biti korisne i nesorbirajuće i nerazgradive polarne referentne kemikalije (primjerice tritij, brom, fluorescein, eozin) za praćenje kretanja vode u stupcu.

13. Mogu se upotrebljavati i analitičke standardne kemikalije za karakterizaciju i/ili identifikaciju proizvoda pretvorbe pronađenih u segmentima tla i u eluatima kromatografskim, spektroskopskim ili ostalim relevantnim metodama.

DEFINICIJE I JEDINICE

14. Vidi Dodatak 1.

KRITERIJI KVALITETE

Iskorištenje

15. Zbroj postotaka ispitivane kemikalije pronađenih u segmentima tla i eluata u stupcu nakon ispiranja predstavlja iskorištenje pokusa ispiranja. Iskorištenja bi se trebala kretati u rasponu od 90 % do 110 % kod radioaktivno obilježenih kemikalija (11) i od 70 % do 110 % kod neobilježenih kemikalija (8).

Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode

16. Ponovljivost analitičke metode za kvantifikaciju ispitivane kemikalije i proizvoda pretvorbe moguće je provjeriti dvostrukom analizom istog ekstrakta segmenta tla ili eluata (vidi stavak 11.).

17. Granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) analitičke metode za ispitivanu kemikaliju i proizvode pretvorbe trebala bi biti najmanje 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ u svim segmentima tla ili eluatu (kao ispitivana kemikalija) ili 0,5 % primijenjene doze u pojedinačnim segmentima, ovisno o tome što je manje. Potrebno je navesti i granicu kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ).

OPIS ISPITNE METODE

Sustav ispitivanja

18. Za ispitivanje se upotrebljavaju podjeljivi i nepodjeljivi stupci za ispiranje izrađeni od odgovarajuće inertnog materijala (primjerice stakla, nehrđajućeg čelika, aluminija, teflona, PVC-a itd.) unutarnjeg promjera najmanje 4 cm i visine najmanje 35 cm. Materijale stupaca potrebno je ispitati s obzirom na moguće interakcije s ispitivanom kemikalijom i/ili njezinim proizvodima pretvorbe. Primjeri odgovarajućih podjeljivih i nepodjeljivih stupaca navedeni su u Dodatku 2.

19. Za punjenje i sabijanje stupaca tla upotrebljavaju se spužva, brizgaljka i vibracijski uređaj.

20. Za dodavanje umjetne kiše stupcima tla mogu se upotrijebiti klip ili peristaltičke crpke, glave za tuširanje, Mariotteove boce ili jednostavni lijevci za dokapavanje.

▼M6

Laboratorijska oprema i kemikalije

21. Potrebna je standardna laboratorijska oprema, a posebno:

(1) analitički instrumenti, poput opreme za GLC, HPLC i TLC, uključujući odgovarajuće detekcijske sustave za analizu obilježenih ili neobilježenih kemikalija ili inverznu metodu razrjeđivanja izotopa,

(2) instrumenti za identifikaciju (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd.),

(3) tekućinski scintilacijski brojač za radioaktivno označenu ispitivanu kemikaliju,

(4) oksidator za izgaranje označenog materijala,

(5) aparatura za ekstrakciju (npr. epruvete za centrifugiranje za hladnu ekstrakciju i aparatura po Soxhletu za kontinuiranu ekstrakciju pod refluksom),

(6) instrumenti za koncentriranje otopina i ekstrakata (npr. rotacijski isparivač).

22. Upotrijebljene kemikalije uključuju: analitički čista organska otapala poput acetona, metanola itd., scintilacijsku tekućinu, otopinu 0,01 M $CaCl_2$ u destiliranoj ili deioniziranoj vodi (umjetna kiša).

Ispitivana kemikalija

23. Ispitivana kemikalija trebala bi za primjenu u stupcu tla biti otopljena u vodi (deioniziranoj ili destiliranoj). Ako je ispitivana kemikalija slabo otopljena u vodi, moguće ju je primijeniti kao formulirani proizvod (po potrebi nakon suspenzije ili emulgacije u vodi) ili u bilo kojem organskom otapalu. U slučaju upotrebe organskog otapala ono bi trebalo biti svedeno na najmanju moguću mjeru i trebalo bi ispariti s površine stupca tla prije početka postupka ispiranja. Čvrste pripravke, poput granula, potrebno je primijeniti u čvrstom obliku, bez vode; radi bolje distribucije po površini stupca tla formulirani proizvod može se prije upotrebe pomiješati s malom količinom kvarcnog pijeska (primjerice 1 g).

24. Količina ispitivane kemikalije primijenjene na stupce tla trebala bi biti dovoljna za otkrivanje najmanje 0,5 % primijenjene doze u svim pojedinačnim segmentima. U slučaju aktivnih kemikalija u sredstvima za zaštitu bilja ona se može temeljiti na maksimalnoj preporučenoj stopi upotrebe (stopa jedne primjene) te bi se u slučaju polaznog i starog ispiranja trebala odnositi na površinu upotrijebljenog stupca tla ([1]).

Referentna kemikalija

25. U pokusima ispiranja potrebno je upotrebljavati referentnu kemikaliju (vidi stavak 12.). Tu je kemikaliju potrebno primijeniti na površinu stupca tla na sličan način kao ispitivanu kemikaliju te po odgovarajućoj stopi zahvaljujući kojoj je moguća adekvatna detekcija kao interni standard s ispitivanom

([1]) Količina koju treba primijeniti na cilindrične stupce tla može se izračunati sljedećom formulom:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

pri čemu je:
M = primijenjena količina po stupcu [μg]
A = stopa primjene [$kg \cdot ha^{-1}$]
d = promjer stupca tla [cm]
π = 3,14

▼M6

kemikalijom na istom stupcu tla ili samostalno na zasebnom stupcu tla. Poželjno je obje kemikalije primijeniti na istom stupcu, osim ako su slično označene.

Tla

Odabir tla

26. Za studije ispiranja polaznom ispitivanom kemikalijom potrebno je upotrebljavati tri do četiri tla različitih pH-vrijednosti, sadržaja organskog ugljika i teksture (12). Smjernice za odabir tala za pokuse ispiranja nalaze se u tablici 1. u nastavku. U slučaju ionizirajućih ispitivanih kemikalija odabrana tla trebala bi uključivati širok raspon pH-vrijednosti radi procjene pokretljivosti kemikalije u ionizirajućim i neionizirajućim oblicima; najmanje tri tla trebala bi imati pH-vrijednost pri kojoj je ispitivana kemikalija u pokretnom obliku.

Tablica 1.

Smjernice za odabir tala za studije ispiranja

Br. tla	pH-vrijednost	Organski ugljik %	Sadržaj gline %	Tekstura (*)
1	> 7,5	3,5 – 5,0	20 – 40	glinasta ilovača
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	praškasta ilovača
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	ilovača
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	ilovasti pijesak
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ilovasti pijesak / pijesak

(*) Prema sustavima FAO i USDA (14).

§ Odgovarajuće varijable trebale bi pokazivati vrijednosti unutar navedenog raspona. Međutim, ako se pojave poteškoće pri pronalasku odgovarajućeg materijala tla, prihvaćaju se vrijednosti niže od navedenih najnižih vrijednosti.

‡ Tla s manje od 0,3 % organskog ugljika mogu narušiti korelaciju između organskog sadržaja i adsorpcije. Zato se preporučuje upotreba tala s minimalnim sadržajem organskog ugljika od 0,3 %.

Tla s vrlo visokim sadržajem ugljika (primjerice > 10 %) mogu biti pravno neprihvatljiva, primjerice za potrebe registracije pesticida.

27. Povremeno mogu biti potrebne ostale vrste tla koje predstavljaju hladnije, umjerene i tropske predjele. Stoga, ako se ipak upotrebljavaju ostale vrste tla, njih je potrebno opisati na temelju jednakih parametara te bi one trebale imati slične razlike u svojstvima kao i vrste opisane u smjernicama za odabir tala za studije ispiranja (vidi prethodnu tablicu 1.), čak i ako u potpunosti ne ispunjavaju kriterije.

28. Za studije ispiranja „starim ostacima” potrebno je upotrebljavati jedno tlo (12). Ono bi trebalo imati sadržaj pijeska > 70 % te sadržaj organskog ugljika od 0,5 do 1,5 % (primjerice tlo br. 4 u tablici 1.). Postoji mogućnost upotrebe više vrsta tala u slučaju važnosti podataka o proizvodima pretvorbe.

29. Potrebno je opisati barem teksturu [% pijeska, % praha, % gline prema sustavima klasifikacije FAO i USDA (14)], pH-vrijednost, kapacitet izmjene kationa, sadržaj organskog ugljika, nasipnu gustoću (za poremećeno tlo) i vodni kapacitet svih tala. Mjerenje mikrobne biomase potrebno je isključivo

▼M6

za tlo koje se upotrebljava tijekom razdoblja starenja/inkubacije prije starog pokusa ispiranja. Informacije o dodatnim svojstvima tla (primjerice klasifikacija tla, mineralogija gline, određenoj površini) mogu biti korisne pri tumačenju rezultata ove studije. Za određivanje svojstava tla mogu se upotrebljavati metode preporučene u referencama (15)(16)(17)(18)(19).

Prikupljanje i skladištenje tala

30. Tla je potrebno uzimati iz gornjeg sloja (horizont A) do najdublje 20 cm. Ostatke vegetacije, krupnije faune i kamenja potrebno je ukloniti. Tla, osim onih koja se upotrebljavaju za starenje ispitivane kemikalije) suše se na zraku na sobnoj temperaturi (poželjno od 20 do 25 °C). Rahljenje je potrebno obaviti uz minimalnu primjenu sile kako bi se što bolje sačuvala izvorna tekstura tla. Tla se prosijavaju kroz sito $\leq$ 2 mm. Preporučuje se pažljiva homogenizacija jer to povećava obnovljivost rezultata. Prije upotrebe tla se mogu skladištiti na sobnoj temperaturi i sušiti na zraku (12). Ne postoji preporučeno ograničenje vremena skladištenja, ali tla koja se skladište duže od tri godine potrebno je prije upotrebe ponovno analizirati s obzirom na sadržaj organskog ugljika i pH-vrijednost.

31. Detaljne informacije o povijesti lokacija polja gdje se uzimaju ispitivana tla trebale bi biti na raspolaganju. Podaci uključuju točnu lokaciju [točno definiranu UTM-om (univerzalna poprečna Mercatorova projekcija / europski horizontalni datum) ili geografskim koordinatama], vegetacijski pokrov, tretiranje sredstvima za zaštitu usjeva, tretiranje organskim i anorganskim gnojivima, dodatke biološkog materijala ili slučajna onečišćenja (12). Ako je u posljednje četiri godine tretirano ispitivanom kemikalijom ili njezinim strukturnim analozima, tlo se ne bi trebalo upotrebljavati za studije ispiranja.

Uvjeti ispitivanja

32. Tijekom razdoblja ispitivanja stupce za ispiranje tla potrebno je čuvati na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi sve dok se ona kreće u rasponu od ± 2 °C. Preporučene su temperature od 18 do 25 °C.

33. Umjetnu je kišu (0,01 M $CaCl_2$) potrebno stalno primjenjivati na površinu stupaca tla po stopi od 200 mm tijekom 48 sati ([1]); ta je stopa istovjetna primjeni 251 ml za stupac unutarnjeg promjera 4 cm. Za potrebe ispitivanja mogu se dodatno upotrebljavati i ostale stope umjetnih padalina i dulje trajanje.

Provedba ispitivanja

Ispiranje polaznom ispitivanom kemikalijom

34. Najmanje dvostruki stupci za ispiranje pune se netretiranim, na zraku osušenim i prosijanim tlom (< 2 mm) do visine od približno 30 cm. Kako bi se osiguralo ujednačeno punjenje, tlo se žlicom stavlja u stupce u malim količinama i pritišće brizgaljkom te istovremeno nježno vibrira sve dok vrh

([1]) Tako se simuliraju iznimno obilne padaline. Primjerice, prosječne su godišnje padaline u središnjoj Europi reda veličine 800 – 1 000 mm.

▼M6

stupca tla dalje ne potone. Ujednačeno punjenje potrebno je radi dobivanja ponovljivih rezultata za stupce za ispiranje. Za pojedinosti o tehnikama punjenja stupaca vidi reference (20) (21) i (22). Radi kontrole ponovljivosti postupka punjenja utvrđuje se ukupna masa tla kojima se stupci pune˘ ([1]); mase dvostrukih stupaca trebale bi biti slične.

35. Nakon punjenja stupci tla prethodno se vlaže umjetnom kišom (0,01 M $CaCl_2$) od dna do vrha kako bi voda istisnula zrak u porama tla. Potom se stupci tla ostavljaju da se uravnoteže, a višak vode otječe zahvaljujući gravitaciji. Metode zasićenja stupaca navedene su u referenci (23).

36. Potom se ispitivana kemikalija i/ili referentna kemikalija primjenjuje na stupce tla (vidi i stavke 23. do 25.). Za postizanje homogene distribucije otopine, suspenzije ili emulzije ispitivane i/ili referentne kemikalije potrebno je primijeniti ravnomjerno po površini stupaca tla. Ako je za primjenu ispitivane kemikalije preporučeno umiješati je u tlo, to je potrebno učiniti s malom količinom (primjerice 20 g) tla i staviti na površinu stupca tla.

37. Na površinu stupaca tla potom se stavljaju stakleni sinterirani disk, staklene kuglice, filtri od staklenih vlakana ili okrugli filtarski papir radi ravnomjerne distribucije umjetne kiše po cijeloj površini i izbjegavanja narušavanja površine tla kapljicama kiše. Što je veći promjer stupca, to je više pažnje potrebno pri primjeni umjetne kiše na stupce tla radi ravnomjerne distribucije umjetne kiše po površini tla. Potom se umjetna kiša stavlja u stupce tla kap po kap klipom, peristaltičkom crpkom ili lijevkom za dokapavanje. Poželjno je eluate prikupiti u frakcijama i evidentirati njihove volumene ([1]).

38. Nakon ispiranja i ostavljanja stupaca da se ocijede oni se dijele na odgovarajući broj segmenata ovisno o informacijama potrebnima za potrebe studije; segmenti se ekstrahiraju odgovarajućim otapalima ili mješavinama otapala te analiziraju za ispitivanu kemikaliju i, ovisno o slučaju, proizvode pretvorbe, za ukupnu radioaktivnosti i za referentnu kemikaliju. Eluati ili frakcije eluata analiziraju se izravno ili nakon ekstrakcije za iste proizvode. Pri upotrebi radioaktivno označene ispitivane kemikalije potrebno je identificirati sve frakcije koje sadržavaju $\geq$ 10 % primijenjene radioaktivnosti.

Ispiranje starim ostacima

39. Svježe tlo (koje nije prethodno sušeno na zraku) tretira se po stopi koja odgovara površini stupaca tla (vidi stavak 24.) radioaktivno označenom ispitivanom kemikalijom te inkubira u aerobnim uvjetima u skladu s ispitnom metodom C.23. (13). Razdoblje inkubacije (starenja) trebalo bi biti dovoljno

([1]) Primjeri su nasipnih gustoća poremećenih tala kako slijedi:za pjeskovito tlo 1,66 g · ml^{-1}
za pjeskovitu ilovaču 1,58 g · ml^{-1}
za ilovaču 1,17 g · ml^{-1}
za praškasto tlo 1,58 g · ml^{-1}

([1]) Tipični volumeni eluata kreću se u rasponu od 230 do 260 ml, što odgovara približno 92 do 104 % ukupno primijenjene umjetne kiše (251 ml) u slučaju upotrebe stupaca tla promjera 4 cm i duljine 30 cm.

▼M6

dugo za proizvodnju znatnih količina proizvoda pretvorbe; preporučuje se razdoblje starenja jednog poluvijeka ispitivane kemikalije ([1]), ali koje ne bi trebalo premašivati 120 dana. Staro se tlo prije ispiranja analizira za ispitivanu kemikaliju i njezine proizvode pretvorbe.

40. Stupci za ispiranje pune se do visine od 28 cm istim tlom (ali sušenim na zraku) koje se upotrebljava u pokusu starenja opisanom u stavku 34., a utvrđuje se i ukupna masa napunjenih stupaca tla. Stupci tla potom se prethodno vlaže prema opisu iz stavka 35.

41. Potom se ispitivana kemikalija i njezini proizvodi pretvorbe primjenjuju na površinu stupaca tla u obliku starih ostataka tla (vidi stavak 39.) kao segment tla visok 2 cm. Ukupna visina stupaca tla (netretirano tlo + staro tlo) ne bi trebala premašiti 30 cm (vidi stavak 34.).

42. Ispiranje se obavlja kako je opisano u stavku 37.

43. Nakon ispiranja segmenti tla i eluati analiziraju se kako je navedeno u stavku 38. za ispitivanu kemikaliju, njezine proizvode pretvorbe i neekstrahiranu radioaktivnost. Kako bi se utvrdila količina starog ostatka koji se nakon ispiranja zadržao u gornjem sloju od 2 cm, taj je segment potrebno zasebno analizirati.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

44. Količine ispitivane kemikalije, proizvoda pretvorbe, neekstraktivnih tvari te, ovisno o slučaju, referentne kemikalije potrebno je navesti u % primijenjene početne doze za svaki segment tla i frakciju eluata. Za svaki je stupac potrebno navesti grafički prikaz utvrđenih postotaka kao funkciju dubina tla.

45. Kad se u studijama ispiranja stupaca upotrebljava referentna kemikalija, njezino ispiranje može se procijeniti na relativnoj skali s pomoću faktora relativne pokretljivosti (engl. *relative mobility factors*, RMF; za definiciju vidi Dodatak 3.) (1) (11) zahvaljujući kojima je moguća usporedba podataka o ispiranju različitih kemikalija dobivenih s pomoću različitih vrsta tala. Primjeri vrijednosti faktora relativne pokretljivosti za niz kemikalija za zaštitu usjeva navedeni su u Dodatku 3.

46. Procjene vrijednosti K_{oc} (koeficijent adsorpcije normiran na organski ugljik) i K_{om} (koeficijent razdiobe normiran na organsku tvar) mogu se dobiti i iz rezultata ispiranja stupaca s pomoću prosječne dubine ispiranja ili utvrđenih korelacija između faktora relativne pokretljivosti i koeficijenta K_{om}, odnosno K_{oc} (4) ili primjenom jednostavne kromatografske teorije (24). Međutim, potonju je metodu potrebno oprezno primjenjivati, posebno kad se uzme u obzir činjenica da postupak ispiranja ne uključuje samo uvjete zasićenog protoka, već i nezasićene sustave.

([1]) U tlu može nastati više glavnih proizvoda pretvorbe do čega može doći u različitim trenucima tijekom studije pretvorbe. U takvim slučajevima može biti potrebno provesti studije ispiranja starim ostacima različite starosti.

▼M6

Tumačenje rezultata

47. Zahvaljujući studiji ispiranja stupaca opisanoj u ovoj metodi moguće je određivanje potencijala ispiranja ili pokretljivosti ispitivane kemikalije (u studijama ispiranja polazne kemikalije) i/ili njezinih proizvoda pretvorbe (u studijama ispiranja starog ostatka) u tlu. Ta ispitivanja nisu kvantitativno predviđanje ponašanja u smislu ispiranja u uvjetima na terenu, ali mogu se upotrijebiti za usporedbu mogućnosti ispiranja jedne kemikalije s ostalima čije je ponašanje u smislu ispiranja možda poznato (24). Slično tome, njima se ne mjeri kvantitativno postotak primijenjene kemikalije koji bi prodrijeti u podzemne vode (11). Međutim, rezultati studija ispiranja stupaca mogu biti pomoć pri odluci o potrebi provedbe dodatnih poluterenskih ili terenskih ispitivanja za kemikalije koje pokazuju velik potencijal pokretljivosti u laboratorijskim ispitivanjima.

Izvješće o ispitivanju

48. Izvješće mora sadržavati:

Ispitivana kemikalija i referentna kemikalija (ovisno o slučaju):

— uobičajeni naziv, kemijski naziv (IUPAC i CAS nomenklatura), CAS broj, kemijska struktura (uz naznaku mjesta oznake u slučaju upotrebe radioaktivno obilježenog materijala) i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— čistoće (nečistoće) ispitivane kemikalije,

— radiokemijska čistoća obilježene kemikalije i specifična aktivnost (po potrebi).

Ispitivana tla:

— podaci o mjestu prikupljanja,

— svojstva tla, poput pH-vrijednosti, sadržaja organskog ugljika i gline, teksture i nasipne gustoće (u slučaju poremećenog tla),

— djelovanje mikroba u tlu (isključivo u slučaju tla koje se upotrebljava za starenje ispitivane kemikalije),

— trajanje skladištenja tla i uvjeti skladištenja.

Uvjeti ispitivanja:

— datumi provedbe studija,

— duljina i promjer stupaca za ispiranje,

— ukupna masa tla u stupcima,

— količina primijenjene ispitivane kemikalije i, ovisno o slučaju, referentne kemikalije,

— količina, učestalost i trajanje primjene umjetne kiše,

— temperatura pokusnih postavki,

— broj ponavljanja (najmanje dva),

— metode za analizu ispitivane kemikalije, proizvoda pretvorbe i, ovisno o slučaju, referentne kemikalije u različitim segmentima tla i eluatima,

— metode za karakterizaciju i identifikaciju proizvoda pretvorbe u segmentima tla i eluatima.

▼M6

Rezultati ispitivanja:

— tablice rezultata izraženih kao koncentracije i kao postotak primijenjene doze za segmente tla i eluate,

— bilanca mase, ovisno o slučaju,

— volumeni eluata,

— dubina ispiranja i, ovisno o slučaju, faktori relativne pokretljivosti,

— grafički prikaz postotka pronađenog u segmentima tla u odnosu na dubinu segmenta tla,

— rasprava i tumačenje rezultata.

LITERATURA

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976.). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995.). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981.). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050. – 1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983.). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227. – 231.

(5) Guth, J.A. (1983.). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26. – 33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987.). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Prilog I. Direktivi Komisije 95/36/EZ od 14. srpnja 1995. o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ o stavljanju sredstava za zaštitu bilja na tržište, SL L 172, 22.7.1995., str. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991.). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986.). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995.). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995.). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italija, 18. – 20. siječnja 1995.

(13) Sljedeća poglavlja ovog Priloga:

Poglavlje A.4., Tlak pare

Poglavlje A.6., Topljivost u vodi

▼**M6**

Poglavlje A.8., Koeficijent razdjeljenja, metoda protresanjem u tikvici

Poglavlje A.24., Koeficijent razdjeljenja (n-oktanol/voda), metoda visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC)

Poglavlje C.7., Razgradnja – abiotička razgradnja: hidroliza kao funkcija pH

Poglavlje C.18., Šaržno ispitivanje adsorpcije/desorpcije u ravnoteži

Poglavlje C.23., Aerobna i anaerobna pretvorba u tlu

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985.) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962.).

(15) Methods of Soil Analysis (1982.). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1986.). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994.). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975.). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998.). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977.). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73. – 78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986.). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190. – 200.

(22) Oliveira, et al. (1996.). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49. – 53.

(23) Shackelford, C. D. (1991.). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177. – 217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975.). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115. – 133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. Smjernica OECD-a za ispitivanje kemikalija, br. 4112, OECD, Pariz

▼M6

Dodatak 1.

Definicije i jedinice

Stari ostatak tla: ispitivana kemikalija i proizvodi pretvorbe prisutni u tlu nakon primjene i nakon dovoljno dugog razdoblja kako bi procesi transporta, adsorpcije, metabolizma i rasipanja mogli promijeniti distribuciju i kemijska svojstva nekih od primijenjenih kemikalija (1).

Umjetna kiša: otopina 0,01 M $CaCl_2$ u destiliranoj ili deioniziranoj vodi.

Prosječna dubina ispiranja: dno odjeljka tla s kumulativnom rekuperiranom kemikalijom = 50 % ukupno rekuperirane ispitivane kemikalije [uobičajeni pokus ispiranja] ili (dno odjeljka tla s kumulativnom rekuperiranom kemikalijom = 50 % ukupno rekuperirane ispitivane kemikalije) – ((debljina sloja starog ostatka)/2) [studija ispiranja starog ostatka].

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Eluat: vodena faza procijeđena kroz profil tla ili stupac tla (1).

Ispiranje: postupak kojim kemikalija prodire u profil tla ili stupac tla (1).

Dubina ispiranja: najdublji segment tla u kojem je nakon postupka ispiranja pronađeno ≥ 0,5 % primijenjene ispitivane kemikalije ili starog ostatka (ekvivalent dubini prodiranja).

Granica detekcije (engl. *limit of Detection*, LOD) i **granica kvantifikacije** (engl. *limit of Quantification*, LOQ): granica detekcije (LOD) koncentracija je kemikalije ispod koje se kemikalija više ne može razlikovati od analitičkih artefakata. Granica kvantifikacije (LOQ) koncentracija je kemikalije ispod koje se koncentracija ne može odrediti s prihvatljivom točnošću.

Faktor relativne pokretljivosti: (dubina ispiranja ispitivane kemikalije (cm)) / (dubina ispiranja referentne kemikalije (cm))

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

Proizvod pretvorbe: sve kemikalije koje nastaju u biotičkim ili abiotičkim reakcijama pretvorbe ispitivane tvari, uključujući CO_2 i proizvode u vezanim ostacima.

Tlo: mješavina mineralnih sastojaka i organsko-kemijskih sastojaka koji sadržavaju spojeve velike molekulske mase s visokim sadržajem ugljika i dušika, nastanjena sitnim (uglavnom mikro) organizmima. Tlom se može rukovati u dvama stanjima:

— neporemećenom: u obliku nastalom s vremenom, s karakterističnim slojevima različitih vrsta tla;

— poremećenom: u obliku u kojem se obično nalazi na poljoprivrednim zemljištima, odnosno o tome u kojem je u ovoj metodi prisutno u uzorcima koji se uzimaju kopanjem (2).

(1) Holland, P.T. (1996.). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167. – 1193.

(2) Smjernica OECD-a za ispitivanje 304 A: svojstvena biorazgradivost u tlu (donesena 12. svibnja 1981.).

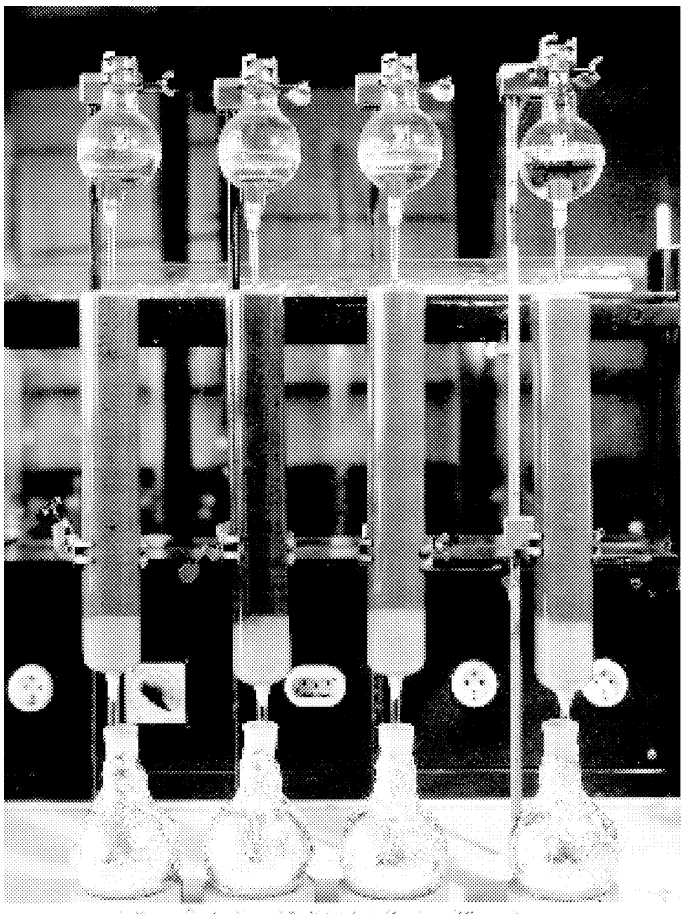
▼**M6**

Dodatak 2.

Slika 1.

Primjer staklenih nepodjeljivih stupaca za ispiranje

duljine 35 cm i unutarnjeg promjera 5 cm (1)

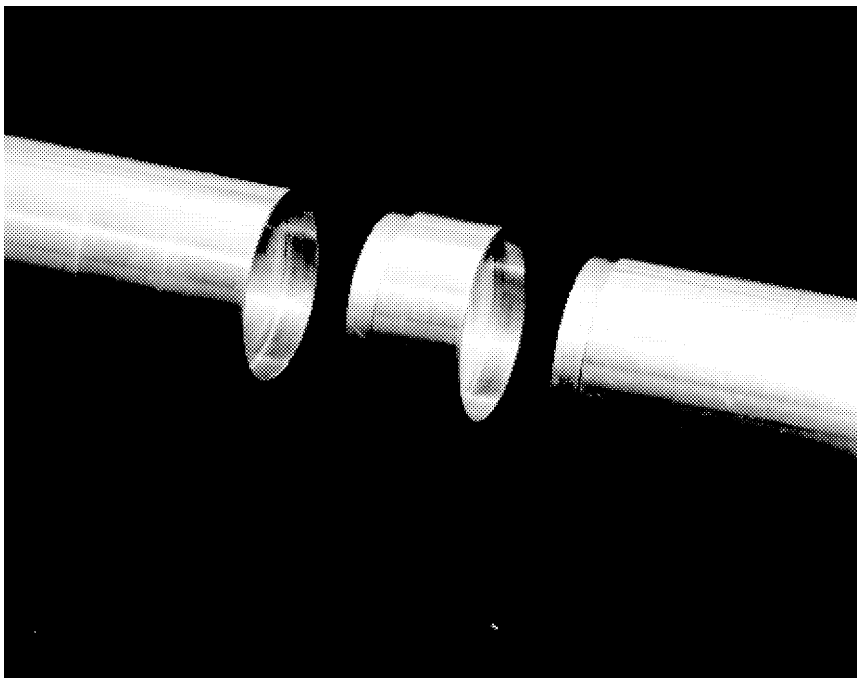


(1) Drescher, N. (1985.). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225. – 236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Slika 2.

Primjer podjeljivog metalnog stupca unutarnjeg promjera 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975.). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203. – 213.

▼M6

Dodatak 3.

Primjeri faktora relativne pokretljivosti (*) za različite kemikalije za zaštitu usjeva (1)(2) i odgovarajuće klase pokretljivosti (+)

Raspon faktora relativne pokretljivosti	Kemikalija (faktor relativne pokretljivosti)	Klasa pokretljivosti
≤ 0,15	Paration (< 0,15), flurodifen (0,15)	Inepokretljivost
0,15 – 0,8	Profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutilazin (0,52), metidation (0,56), prometrin (0,59), propazin (0,64), alaklor (0,66), metolaklor (0,68)	II blaga pokretljivost
0,8 – 1,3	monuron (**) (1,00), atrazin (1,03), simazin (1,04), fluometuron (1,18)	III umjerena pokretljivost
1,3 – 2,5	Prometon (1,67), cianazin (1,85), bromacil (1,91), karbutilat (1,98)	IV prilična pokretljivost
2,5 – 5,0	karbofuran (3,00), dioksakarb (4,33)	V pokretljivost
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI iznimna pokretljivost

(*) Faktor relativne pokretljivosti izračunava se kako slijedi (3):

$$\mathrm{RMF} = \frac{\text{dubina ispiranja ispitivane kemikalije(cm)}}{\text{dubina ispiranja referentne kemikalije(cm)}}$$

(**) Referentna kemikalija

\+ Ostali sustavi klasifikacije pokretljivosti kemikalije u tlu temelje se na vrijednostima R_f iz kromatografije tankog sloja tla \big(4) i vrijednostima K_{oc} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985.). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment". Canterbury, UK, 1. – 3. srpnja 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987.). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91. – 106.

(3) Harris, C.I. (1967.). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214. – 216.

(4) Helling, C.S. (1971.). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743. – 748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981.). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991.). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165. – 174.

▼M6

C.45. PROCJENA EMISIJA U OKOLIŠ IZ DRVA TRETIRANOG ZAŠTITNIM SREDSTVIMA: LABORATORIJSKA METODA ZA DRVENE PREDMETE U DOTICAJU SA SLATKOM ILI MORSKOM VODOM KOJI NISU U NJU URONJENI

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 313 (2007.). Emisije u okoliš iz drva tretiranog zaštitnim sredstvima treba kvantificirati radi procjene rizika tretiranog drva za okoliš. Ovom se ispitnom metodom opisuje laboratorijska metoda za procjenu emisija iz drva tretiranog zaštitnim sredstvima u slučaju dviju mogućnosti ulaska emisija u okoliš:

— Emisije iz tretiranog drva u doticaju sa slatkom vodom. Mogućnost ulaska emisija iz površine tretiranog drva u vodu.

— Emisije iz tretiranog drva u doticaju s morskom vodom. Mogućnost ulaska emisija iz površine tretiranog drva u morsku vodu.

2. Svrha je ove ispitne metode ispitivanje emisija iz drva i drvenih predmeta u doticaju sa slatkom ili morskom vodom koji nisu u nju uronjeni. Klase upotrebe u međunarodnoj su upotrebi za kategorizaciju biološkog rizika kojem će tretirani predmet biti podvrgnut. Klasama upotrebe definira se i upotreba tretiranog predmeta te određuju područja okoliša (zrak, voda, tlo) kojima prijeti mogući rizik od drva tretiranog zaštitnim sredstvima.

3. Ispitna je metoda laboratorijski postupak za prikupljanje uzoraka (emisata) iz vode u koju je uronjeno tretirano drvo tijekom sve duljih vremenskih intervala nakon izlaganja. Količina emisija u emisatu povezana je s površinom drva i trajanjem izloženosti radi procjene strujanja u mg/m^2/dan. Na taj se način može procijeniti strujanje (stopa ispiranja) nakon duljih razdoblja izlaganja.

4. Količina emisija može se upotrijebiti za procjenu rizika za okoliš tretiranog drva.

POČETNA RAZMATRANJA

5. Ne pretpostavlja se da su karakter i težina mehanizma ispiranja površine drva slatkom vodom jednaki ispiranju površine drva morskom vodom. Stoga je za tretiranje drva zaštitnim proizvodima ili smjesama za upotrebu u morskoj vodi potrebna studija ispiranja drva za morsku vodu.

6. Drvo tretirano zaštitnim sredstvima trebalo bi predstavljati drvo u komercijalnoj upotrebi. Drvo je potrebno tretirati u skladu s uputama proizvođača o zaštitnim sredstvima te s odgovarajućim standardima i specifikacijama. Prije početka ispitivanja potrebno je navesti parametre o kondicioniranju drva nakon tretiranja.

7. Upotrijebljeni uzorci drva trebali bi predstavljati upotrijebljene predmete (primjerice u smislu vrste, gustoće i ostalih svojstava).

▼M6

8. Drvo ili tretirano drvo, čija se površina obvezno mora dodatno tretirati (primjerice bojom koja se nanosi zbog zahtjeva za komercijalnu upotrebu), može se ispitivati postupkom penetracije ili površinskog nanošenja.

9. Sastav, količina, pH-vrijednost i fizički oblik vode važni su pri utvrđivanju kvalitete, sadržaja i prirode emisija iz drva.

NAČELO ISPITNE METODE

10. Primjerci drva tretiranog zaštitnim sredstvima uranjaju se u vodu. Voda (emisat) prikuplja se i kemijski analizira više puta tijekom razdoblja izlaganja, što je dostatno za izradu statističkih izračuna. Stope emisije u mg/m^2/dan izračunavaju se iz rezultata analize. Potrebno je evidentirati razdoblja uzorkovanja. Ispitivanja na netretiranim uzorcima mogu se prekinuti ako se u prvim trima podatkovnim točkama ne otkrije pozadina.

11. Zahvaljujući uključivanju primjeraka netretiranog drva moguće je odrediti pozadinske razine emisata iz drva za koji nisu upotrijebljena zaštitna sredstva.

KRITERIJI KVALITETE

Točnost

12. Točnost ispitne metode za procjenu emisija ovisi o ispitnim primjercima koji predstavljaju drvo tretirano komercijalnim sredstvima, mjeri u kojoj voda predstavlja stvarnu vodu i mjeri u kojoj režim izlaganja predstavlja prirodne uvjete.

13. Točnost, preciznost i ponovljivost analitičke metode potrebno je odrediti prije provedbe ispitivanja.

Mjerna obnovljivost

14. Tri se uzorka vode prikupljaju i analiziraju te se kao vrijednost emisije uzima srednja vrijednost. Mjerna obnovljivost rezultata unutar laboratorija i između različitih laboratorija ovisi o režimu uranjanja i drvima koja su upotrijebljena kao ispitni primjerci.

Prihvatljivi raspon rezultata

15. Prihvatljiv je raspon rezultata ovog ispitivanja u kojem se gornje i donje vrijednosti razlikuju manje od jednog reda veličine.

UVJETI ISPITIVANJA

Voda

16. Scenariji ispiranja slatkom vodom: preporučuje se upotreba deionizirane vode (primjerice ASTM D 1193 vrsta II.) za ispitivanje ispiranja radi ocjene drva izloženog slatkoj vodi. Temperatura vode iznosi 20 °C +/– 2 °C, a izmjerena pH-vrijednost i temperatura vode navedene su u izvješću o testiranju. Zahvaljujući analizi uzoraka vode uzetih prije uranjanja tretiranih primjeraka moguća je procjena analiziranih kemikalija u vodi. Riječ je o kontroli radi utvrđivanja pozadinskih razina kemikalija koje se potom kemijski analiziraju.

▼M6

17. Scenariji ispiranja morskom vodom: preporučuje se upotreba sintetičke morske vode (primjerice ASTM D 1141 zamjenska voda iz oceana, bez teških metala) za ispitivanje ispiranja radi ocjene drva izloženog morskoj vodi. Temperatura vode iznosi 20 °C +/– 2 °C, a izmjerena pH-vrijednost i temperatura vode navedene su u izvješću o testiranju. Zahvaljujući analizi uzoraka vode uzetih prije uranjanja tretiranih primjeraka moguća je procjena analiziranih kemikalija u vodi. Riječ je o kontroli za analizu pozadinskih razina važnih kemikalija.

Ispitni primjerci drva

18. Primjerci drva trebali bi biti tipični primjerci drva koje se upotrebljava za ispitivanje učinkovitosti zaštitnih sredstava za drvo. Preporučene su vrste *Pinus sylvestris L.* (obični bor), *Pinus resinosa Ait*. (američki crveni bor) ili *Pinus spp* (bor). Dodatna je ispitivanja moguće provesti na drugim vrstama.

19. Potrebno je upotrijebiti drvo ravnih godova i bez čvorova. Potrebno je izbjegavati materijal s izgledom smole. Drvo bi trebalo biti tipičan primjerak komercijalno dostupnog drva. Potrebno je evidentirati izvor, gustoću i broj godova na 10 mm.

20. Preporučuje se da su ispitni primjerci drva u skladu s normom EN 113 kompleti od pet blokova veličine 25 mm × 50 mm × 15 mm s uzdužnim plohama paralelnima s godovima, iako se mogu upotrijebiti i ostale dimenzije poput 50 mm × 150 mm × 10 mm. Ispitni bi primjerak trebao u potpunosti biti uronjen u vodu. Ispitni primjerci sastoje se od 100 %-tne bjelike. Svaki se primjerak jedinstveno obilježava radi identifikacije tijekom ispitivanja.

21. Ispitne primjerke potrebno je izblanjati ili zagladiti, a površine nije potrebno brusiti.

22. Broj kompleta ispitnih primjeraka drva radi analize iznosi najmanje pet: tri kompleta primjeraka tretiraju se zaštitnim sredstvima, jedan se komplet ne tretira, dok jedan komplet služi za procjenu udjela vlage u pećnici sušenih ispitnih primjeraka prije tretiranja. Priprema se dovoljno ispitnih primjeraka radi odabira triju kompleta uzoraka koji su unutar 5 % srednje vrijednosti zadržavanja zaštitnih sredstava skupine ispitnih primjeraka.

23. Svi ispitni primjerci završno se zabrtve kemikalijom koja sprečava penetraciju zaštitnog sredstva u krajnje godove primjeraka ili ispiranje s krajnjih godova primjeraka. Potrebno je razlikovati primjerke za postupke površinskog nanošenja i penetracije radi nanošenja završnog brtvila. Završno brtvilo treba nanijeti prije tretiranja samo u slučaju površinskog nanošenja.

24. Krajnji god treba biti otvoren za tretiranje postupkom penetracije. Stoga primjerci moraju biti završno zabrtvljeni na kraju razdoblja kondicioniranja. Emisiju je potrebno procijeniti samo za uzdužnu površinu. Brtvila je potrebno provjeriti i ponovno nanijeti prije početka ispiranja te ih nakon toga nije potrebno ponovno nanositi.

▼M6

Spremnik za uranjanje

25. Spremnik je izrađen od inertnog materijala i dovoljno je velik za uranjanje pet primjeraka drva u skladu s normom EN113 u 500 ml vode zbog čega omjer površine i volumena vode iznosi 0,4 cm^2/ml.

Stalak za ispitivanje primjeraka

26. Ispitni primjerci nalaze se na stalku na kojem sve izložene površine primjerka mogu biti u doticaju s vodom.

POSTUPAK TRETIRANJA ZAŠTITNIM SREDSTVIMA

Priprema tretiranih ispitnih primjeraka

27. Ispitni primjerak drva koji je potrebno tretirati ispitivanim zaštitnim sredstvom tretira se metodom navedenom za to zaštitno sredstvo koja može uključivati postupak penetracije ili površinskog nanošenja umakanjem, raspršivanjem ili kistom.

Zaštitna sredstva koja je potrebno nanijeti postupkom penetracije

28. Potrebno je pripremiti otopinu zaštitnog sredstva kojom će se postići utvrđena apsorpcija ili zadržavanje u postupku penetracije. Ispitni primjerak drva važe se i mjeri. Postupak penetracije trebao bi biti u skladu s postupkom za nanošenje zaštitnog sredstva na drvo za upotrebu u klasi upotrebe 4 ili 5. Primjerak se ponovno važe nakon tretiranja, a zadržavanje zaštitnog sredstva (kg/m^3) računa se formulom:

$$\frac{\text{Masa nakon tretiranja(kg)} - \text{masa prije tretiranja(kg)}}{\text{Volumen ispitnog primjerka(m}^3\text{)}} \times \frac{\text{koncentracija otopine(\% mase/masa)}}{100}$$

29. Napomena: u ovom se ispitivanju može upotrijebiti drvo tretirano u industrijskim pogonima \big(primjerice vakuumskom impregnacijom). Primijenjene je postupke potrebno zabilježiti, a zadržavanje materijala tretiranog na ovaj način analizirati i zabilježiti.

Zaštitna sredstva koja je potrebno nanijeti postupcima površinskog nanošenja

30. Postupak površinskog nanošenja uključuje umakanje, raspršivanje ili bojenje kistom ispitnih primjeraka drva. Postupak i količina nanošenja (primjerice litre/m^2) trebali bi biti u skladu s postupkom i količinom nanošenja za površinsko nanošenje zaštitnog sredstva.

31. I u ovom je slučaju napomena da se u ovom ispitivanju može upotrijebiti drvo tretirano u industrijskim pogonima. Primijenjene je postupke potrebno zabilježiti, a zadržavanje materijala tretiranog na ovaj način analizirati i zabilježiti.

Kondicioniranje ispitnih primjeraka nakon ispitivanja

32. Tretirane ispitne primjerke potrebno je nakon tretiranja kondicionirati u skladu s preporukama dobavljača ispitivanog zaštitnog sredstva prema zahtjevima za pakiranje zaštitnog sredstva ili u skladu s komercijalnim praksama tretiranja ili normom EN 252.

▼M6

Priprema i odabir ispitnih primjeraka

33. Srednje zadržavanje skupine ispitnih primjeraka izračunava se poslije kondicioniranja nakon tretiranja te se za mjerenja ispiranja nasumično biraju tri reprezentativna kompleta primjeraka sa zadržavanjem unutar 5 % srednje vrijednosti skupine.

POSTUPAK MJERENJA EMISIJE ZAŠTITNIH SREDSTAVA

Metoda uranjanja

34. Ispitni se primjerci važu i potom u potpunosti uranjaju u vodu uz bilježenje datuma i vremena. Spremnik je pokriven radi smanjivanja isparavanja.

35. Voda se mijenja u sljedećim intervalima: nakon šest sati, jednog dana, dva dana, četiri dana, osam dana, 15 dana, 22 dana, 29 dana (napomena: riječ je o ukupnom trajanju, a ne o trajanju intervala). Potrebno je evidentirati vrijeme i datum izmjene vode te masu vode izvađenu iz spremnika.

36. Nakon svake izmjene vode uzorak vode u koju je bio uronjen komplet ispitnih primjeraka zadržava se za naknadnu kemijsku analizu.

37. Zahvaljujući postupku uzorkovanja moguć je izračun profila količine emisija tijekom vremena. Uzorke je potrebno pohraniti u uvjetima za očuvanje predmeta analize, primjerice na tamnom mjestu u frižideru kako bi se smanjio rast mikroba u uzorku prije analize.

MJERENJA EMISIJE

Tretirani uzorci

38. Prikupljena se voda po potrebi kemijski analizira na aktivne tvari i/ili relevantne degradacijske/transformacijske proizvode.

Netretirani uzorci

39. Zahvaljujući prikupljanju vode (emisata) u ovom sustavu i naknadnoj analizi kemikalija koje su isprane s netretiranih uzoraka drva moguća je procjena moguće stope emisije zaštitnog sredstva s netretiranog drva. Zahvaljujući prikupljanju i analizi emisata nakon duljih razdoblja izlaganja moguća je procjena stope promjene stope emisije tijekom vremena. Ta je analiza kontrolni postupak za utvrđivanje pozadinskih razina ispitivane kemikalije u netretiranom drvu kako bi se potvrdilo da drvo upotrijebljeno kao izvor uzoraka nije prethodno tretirano zaštitnim sredstvom.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Kemijske analize

40. Prikupljena voda kemijski se analizira, a njezin se rezultat navodi u odgovarajućim jedinicama, primjerice u μg/l.

Dostava podataka

41. Svi se rezultati evidentiraju. U dodatku je naveden primjer predloženog obrasca za evidenciju za jedan komplet tretiranih ispitnih primjeraka i tablica sa sažetkom za izračun srednjih vrijednosti emisije tijekom svakog intervala uzorkovanja.

42. Dnevno strujanje emisije u mg/m^2/dan izračunava se uzimanjem triju izmjerenih vrijednosti iz triju replika i dijeljenjem s brojem dana uranjanja.

▼M6

Izvješće o ispitivanju

43. U izvješću o ispitivanju navode se najmanje sljedeće informacije:

— naziv dobavljača ispitivanog zaštitnog sredstva,

— poseban ili jedinstven naziv ili oznaka ispitivanog zaštitnog sredstva,

— komercijalan ili uobičajen naziv aktivnih sastojaka uz generički opis pomoćnih tvari (primjerice pomoćnog otapala, smole) i sastav sastojaka u % m/m,

— relevantno zadržavanje ili opterećenje (u kg/m^3, odnosno l/m^2) za drvo koje se upotrebljava u doticaju s vodom,

— vrste upotrijebljenog drva, uključujući njegovu gustoću i stopu rasta u godovima na 10 mm,

— opterećenje ili zadržavanje ispitivanog zaštitnog sredstva i formula za izračun zadržavanja izraženog u l/m^2 ili kg/m^3,

— metoda nanošenja zaštitnog sredstva uz navođenje rasporeda tretiranja u postupku penetracije te metoda nanošenja u slučaju površinskog tretiranja,

— datum nanošenja zaštitnog sredstva i procjena udjela vlage ispitnih primjeraka izražena u postotku,

— primijenjeni postupci kondicioniranja uz navođenje vrste, uvjeta i trajanja,

— podaci o vrsti i broju nanošenja završnog brtvila,

— podaci o svim naknadnim tretiranjima drva, primjerice podaci o dobavljaču, vrsti, svojstvima i količini boje,

— vrijeme i datum svakog uranjanja, količina vode u koju su uronjeni svi ispitni primjerci pri svakom uranjanju te količina vode koju je drvo apsorbiralo tijekom uranjanja,

— sva odstupanja od opisane metode i svi čimbenici koji su mogli utjecati na rezultate.

LITERATURA

(1) Europska norma EN 84 – 1997. Sredstva za zaštitu drva. Ubrzano starenje tretiranog drva prije biološkog testiranja. Postupak ispiranja.

(2) Europska norma EN 113 – 2004. Sredstva za zaštitu drva. Metoda ispitivanja za određivanje učinkovitosti zaštite protiv razarača drva iz odjeljka basidiomycetes. Određivanje toksičnih vrijednosti.

(3) Europska norma EN 252 – 1989. Metoda ispitivanja na otvorenom za određivanje zaštitne učinkovitosti sredstva za zaštitu drva u dodiru sa zemljom.

(4) Europska norma EN 335 – Dio 1: 2006. Trajnost drva i proizvoda na osnovi drva – Definicije upotreba razreda – Dio 1: Općenito.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Dodatak 1.

Obrazac za evidenciju za ispitnu metodu

Procjena emisija u okoliš iz drva tretiranog zaštitnim sredstvima: laboratorijska metoda za drvene predmete u doticaju sa slatkom ili morskom vodom koji nisu u nju uronjeni

Ispitna ustanova	

Sredstvo za zaštitu drva

Dobavljač zaštitnog sredstva	
Poseban ili jedinstven naziv ili oznaka zaštitnog sredstva	
Komercijalan ili uobičajen naziv zaštitnog sredstva	
Pomoćne tvari	
Relevantno zadržavanje za drvo koje se upotrebljava u doticaju s vodom	

Nanošenje

Metoda nanošenja	
Datum nanošenja	
Formula za izračun zadržavanja:	
Postupak kondicioniranja	
Trajanje kondicioniranja	
Završno brtvilo / broj nanošenja	
Naknadno tretiranje	po potrebi

Ispitni primjerci

Vrste drva	
Gustoća drva	(najmanja … srednja vrijednost … najveća)
Stopa rasta (broj godova na 10 mm)	(najmanja … srednja vrijednost … najveća)
Udjel vlage	

▼M6

Stalci za ispitivanje (*)	**Zadržavanje (primjerice u kg/m^3)**
Tretirani „x”	Srednja vrijednost i standardno odstupanje ili raspon od pet primjeraka
Tretirani „y”	Srednja vrijednost i standardno odstupanje ili raspon od pet primjeraka
Tretirani „z”	Srednja vrijednost i standardno odstupanje ili raspon od pet primjeraka
Netretirani	
Varijacija parametara ispitne metode	Primjerice kvaliteta vode, dimenzija ispitnih primjeraka itd.

(*) x, y, z jesu tri paralelna uzorka

▼M6

Vrijeme	Izmjena vode	Masa primjerka		Apsorpcija vode		Uzorak vode				
		Tretirani (srednja vrijednost)	Netretirani	Tretirani (srednja vrijednost)	Netretirani		Ispitna voda	x	y	z
	Datum	g	g	g	g	br.	pH-vrijednost	pH-vrijednost	pH-vrijednost	pH-vrijednost
početak										
šest sati						1				
24 sata						2				
dva dana						3				
četiri dana						4				
osam dana						5				
15 dana						6				
22 dana						7				
29 dana						8				

▼M6

Za svaki aktivni sastojak popunite zasebnu tablicu.

Vrijeme	Izmjena vode	Rezultati analize															
		Netretirani primjerci			Tretirani primjerci												
					Koncentracija aktivnog sastojka u vodi				Emitirana količina				Stopa emisije			
		Koncentracija aktivnog sastojka u vodi mg/l	Emitirana količina mg/m^2	Stopa emisije mg/m^2/dan	x	y	z	Srednja vrijed-nost	x	y	z	Srednja vrijed-nost	x	y	z	Srednja vrijed-nost
	Datum				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan
šest sati																
24 sata																
dva dana																
četiri dana																
osam dana																
15 dana																
22 dana																
29 dana																

Napomena: S obzirom na mogućnost upotrebe rezultata netretiranih uzoraka za ispravak stopa emisije tretiranih uzoraka, prvo je potrebno navesti rezultate netretiranih uzoraka, a sve bi vrijednosti tretiranih uzoraka trebale biti „ispravljene vrijednosti”. Moguć je i ispravak za analizu početne vode.

▼**M6**

Dodatak 2.

Definicije

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Ispitivana kemikalija: Bilo koja tvar ili smjesa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

▼M6

C.46. BIOAKUMULACIJA U BENTIČKIM OLIGOHETIMA IZ SEDIMENTA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 315 (2008.), Endobentičke životinje koje konzumiraju sediment mogu biti izložene tvarima povezanima sa sedimentom. Među tim konzumentima sedimenta vodeni oligoheti imaju važnu ulogu na dnima vodenih sustava. Žive u sedimentu i često predstavljaju najbrojniju vrstu, posebno u staništima u kojima su okolišni uvjeti štetni za ostale životinje. Bioturbacijom sedimenta te služenjem kao plijen ove životinje mogu snažno utjecati na bioraspoloživost takvih tvari ostalim organizmima, primjerice bentivornim ribama. Za razliku od epibentičkih organizama, endobentički vodeni oligoheti ruju u sedimentu te konzumiraju čestice sedimenta ispod površine sedimenta. Zbog toga ovi su organizmi izloženi tvarima brojnim ostalim načinima unošenja, uključujući izravni kontakt, konzumiranje kontaminiranih čestica sedimenta, pornu vodu i vodu iznad sedimenta. Neke vrste bentičkih oligoheta koje se trenutačno upotrebljavaju u ekotoksikološkim ispitivanjima opisane su u Dodatku 6.

2. Parametri koji karakteriziraju bioakumulaciju tvari ponajprije obuhvaćaju faktor bioakumulacije (BAF), konstantu brzine apsorpcije sedimenta (k_s) i konstantu brzine eliminacije (k_e). Detaljne definicije tih parametara navedene su u Dodatku 1.

3. Da bi se ocijenio bioakumulacijski potencijal tvari općenito te da bi se istražila bioakumulacija tvari koje se obično dijele u ili na sedimentima, potrebna je ispitna metoda specifična za ovaj odjeljak (1)(2)(3)(4).

4. Ova je ispitna metoda namijenjena za procjenu bioakumulacije tvari povezanih sa sedimentom u endobentičkim oligohetnim crvima. Ispitivana se tvar postupkom spikinga dodaje u sediment. Sediment obrađen postupkom spikinga upotrebljava se u cilju simulacije kontaminiranog sedimenta.

5. Ova se metoda temelji na postojećim metodama ispitivanja toksičnosti sedimenta i bioakumulacije (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Ostali korisni dokumenti jesu: rasprave i rezultati međunarodne radionice (11) te ishod međunarodnog prstenastog testa (12).

6. Ovaj se test primjenjuje na stabilne, neutralne organske tvari koje se obično vežu za sedimente. Ovom se metodom može mjeriti i bioakumulacija stabilnih metaloorganskih spojeva koji se vežu za sediment. Bez izmjene plana ispitivanja u pogledu volumena supstrata i vode te možda veličine tkiva uzorka metoda nije primjenjiva na metale i ostale elemente u tragovima (11).

PREDUVJETI I INFORMACIJE O ISPITIVANOJ TVARI

7. Postoji samo nekoliko dobro poznatih kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR-ova) o procesima bioakumulacije koji su trenutačno dostupni (14). Najčešće upotrebljavani odnos jest korelacija između bioakumulacije i biokoncentracije stabilnih organskih tvari i njihove lipofilnosti (izražena kao logaritam podjelnog koeficijenta oktanol/voda (log K_{ow}); za definiciju vidi

▼**M6**

Dodatak 1.) koja je razvijena radi opisa razdiobe tvari između vode i riba. S pomoću ovog odnosa utvrđene su i korelacije za odjeljke sedimenta (15)(16)(17)(18). Korelacija log K_{ow}-log BCF kao najvažniji QSAR može pomoći u prvoj preliminarnoj procjeni potencijala bioakumulacije tvari koje se vežu za sediment. Međutim, na BAF može utjecati sadržaj lipida ispitivanog organizma te sadržaj organskog ugljika sedimenta. Stoga se podjelni koeficijent organski ugljik-voda (K_{oc}) može upotrebljavati i kao najvažniji determinant bioakumulacije organskih tvari koje se vežu za sediment.

8. Ovo se ispitivanje primjenjuje na:

— stabilne organske tvari čije su log K_{ow} vrijednosti između 3,0 i 6,0 (5)(19) i na superlipofiličke tvari s vrijednostima log K_{ow} većima od 6,0 (5);

— tvari koje pripadaju razredu organskih tvari poznatih po svojem bioakumulacijskom potencijalu u živim organizmima, primjerice surfaktantima ili jako adsorptivnim tvarima (primjerice visok K_{oc}).

9. Prije početka istraživanja potrebno je prikupiti informacije o ispitivanoj tvari, poput mjera opreza, ispravnih uvjeta skladištenja i stabilnosti te analitičke metode. Smjernice za ispitivanje tvari čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u literaturi pod (20) i (21). Prije provedbe ispitivanja bioakumulacije s vodenim oligohetima trebale bi biti poznate sljedeće informacije o ispitivanoj tvari:

— opći naziv, kemijski naziv (po mogućnosti IUPAC naziv), strukturna formula, CAS registarski broj, čistoća;

— topljivost u vodi [ispitna metoda A.6. (22)];

— podjelni koeficijent oktanol-voda, K_{ow} [ispitne metode A.8., A.24. (22)];

— podjelni koeficijent sediment-voda, izražen kao K_d ili K_{oc} [ispitna metoda C.19. (22)];

— hidroliza [ispitna metoda C.7. (22)];

— fototransformacija u vodi (23);

— tlak pare [ispitna metoda A.4. (22)];

— laka biorazgradivost [ispitne metode C.4. i C.29. (22)];

— površinska napetost [ispitna metoda A.5. (22)];

— kritična micelacijska koncentracija (24).

Osim toga, sljedeće bi informacije, ako su dostupne,– bile važne:

— biorazgradnja u vodenom okolišu [ispitne metode C.24. i C.25. (22)];

— konstanta Henryjeva zakona.

10. Radioaktivno obilježene ispitivane tvari mogu olakšati analizu uzoraka vode, sedimenta i bioloških uzoraka te se mogu upotrijebiti u definiranju potrebe za identifikacijom i kvantifikacijom produkata razgradnje. Ovdje opisana metoda potvrđena je u međunarodnom prstenastom testu (12) za tvari obilježene $s^{14}C$. Ako se mjere ukupni radioaktivni ostaci, faktor bioakumulacije

▼M6

(BAF) temelji se na polaznoj tvari, uključujući sve zadržane produkte razgradnje. Analizom i kvantifikacijom postotka polazne tvari i njezinih produkata razgradnje u uzorcima uzetima na kraju faze apsorpcije ili na vršnoj razini bioakumulacije mogu se kombinirati istraživanje metabolizma i istraživanje bioakumulacije. U svakom slučaju preporučuje se temeljiti izračun BAF-a na koncentraciji polazne tvari u organizmima, a ne samo na ukupnim radioaktivnim ostacima.

11. Uz svojstva ispitivane tvari, ostale potrebne informacije jesu toksičnost za vrste oligoheta koje će biti upotrijebljene u ispitivanju, poput srednje smrtonosne koncentracije (LC_{50}) za vrijeme potrebno za fazu apsorpcije, kako bi se osigurale koncentracije izlaganja koje su mnogo niže od toksičnih razina. Ako su dostupne, prednost je potrebno dati vrijednostima toksičnosti dobivenima u dugotrajnim studijama o subletalnim konačnim učincima (EC_{50}). Ako takvi podaci nisu poznati, korisne se informacije mogu dobiti ispitivanjem akutne toksičnosti u uvjetima koji su identični uvjetima ispitivanja bioakumulacije ili iz podataka o toksičnosti ostalih surogatnih vrsta.

12. Mora biti dostupna odgovarajuća analitička metoda poznate točnosti, preciznosti i osjetljivosti na kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama, u sedimentu i u biološkom materijalu, s pojedinostima o pripremi i skladištenju uzoraka kao i sigurnosno-tehničkim listovima za materijale. Potrebno je poznavati i analitičke granice detekcije ispitivane tvari u vodi, sedimentu i u tkivu crva. Ako se upotrebljava radioaktivno obilježena ispitivana tvar, moraju se znati i specifična radioaktivnost (primjerice Bq mol^{-1}), položaj radioaktivno obilježenih atoma i postotak radioaktivnosti povezan s nečistoćama. Specifična radioaktivnost ispitivane tvari trebala bi biti čim veća kako bi se utvrdile čim niže ispitivane koncentracije.

13. Trebale bi biti dostupne informacije o svojstvima sedimenta koji će se upotrijebiti (primjerice podrijetlo sedimenta ili njegovih sastojaka, pH-vrijednost i koncentracija amonijaka porne vode (terenski sedimenti), sadržaj organskog ugljika (TOC), distribucija veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline) i postotak suhe mase) (6).

NAČELO ISPITIVANJA

14. Ispitivanje se sastoji od dviju faza: faze apsorpcije (faze izlaganja) i faze eliminacije (faze nakon izlaganja). Tijekom faze apsorpcije crvi su izloženi sedimentu u koji je postupkom spikinga dodana ispitivana tvar, prelivenom obrađenom vodom i uravnoteženom po potrebi (11). Skupine kontrolnih crva drže se u istim uvjetima, bez ispitivane tvari.

15. Za fazu eliminacije crvi se prenose u sustav sediment-voda u kojem nema ispitivane tvari. Faza eliminacije nužna je kako bi se dobile informacije o brzini kojom ispitni organizmi izlučuju ispitivanu tvar (19)(25). Faza eliminacije uvijek je potrebna, osim ako je apsorpcija ispitivane tvari tijekom faze izlaganja bila neznatna (primjerice nema statističke razlike između koncentracije ispitivane tvari u ispitnih i kontrolnih crva). Ako se tijekom faze apsorpcije ne postigne stabilno stanje, rezultati faze eliminacije mogu se upotrijebiti za određivanje kinetičke – BAF_k konstante te konstante brzine apsorpcije i eliminacije. Promjena koncentracije ispitivane tvari u/na crvima prati se tijekom obiju faza ispitivanja.

16. Tijekom faze apsorpcije mjerenja se vrše dok BAF ne postigne plato ili stabilno stanje. Prema zadanim postavkama faza apsorpcije trebala bi trajati 28 dana. Praktična iskustva pokazala su da je faza apsorpcije u trajanju od 12 do 14 dana dovoljna da nekoliko stabilnih, neutralnih organskih tvari postigne stabilno stanje (6)(8)(9).

▼M6

17. Međutim, ako se unutar 28 dana ne postigne stabilno stanje, prijenosom izloženih oligoheta u posude koje sadržavaju isti medij bez ispitivane tvari pokreće se faza eliminacije. Faza eliminacije završava ili kada se postigne 10 % razine koncentracije izmjerene u crvima 28. dana faze apsorpcije ili nakon maksimalnog trajanja od deset dana. Kao dodatni krajnji učinak, odnosno kao neeliminirani ostaci (NER), navodi se razina ostataka u crvima na kraju faze eliminacije. Faktor bioakumulacije (BAF_{ss}) po mogućnosti se izračunava i kao omjer koncentracije u crvima (C_a) i u sedimentu (C_s) u očigledno stabilnom stanju te kao faktor kinetičke bioakumulacije, BAF_K, kao omjer konstante brzine apsorpcije iz sedimenta (k_s) i konstante brzine eliminacije (k_e) pod pretpostavkom kinetike prvog reda. Ako se unutar 28 dana ne postigne stabilno stanje, izračunajte BAF_K iz konstanti brzine apsorpcije i brzine eliminacije. Za izračun vidi Dodatak 2. Ako se ne može primijeniti kinetika prvog reda, potrebno je primijeniti složenije modele (Dodatak 2. i referenca (25.)).

18. Ako se stabilno stanje ne postigne unutar 28 dana, faza apsorpcije može se fakultativno produžiti podvrgavanjem skupina izloženih crva. ako ih ima, daljnjim mjerenjima dok se ne postigne stabilno stanje. Istodobno, faza eliminacije trebala bi, neovisno o svemu, započeti 28. dana faze apsorpcije.

19. Konstanta brzine apsorpcije, konstanta (ili konstante, kada su obuhvaćeni složeniji modeli) brzine eliminacije, faktor kinetičke bioakumulacije (BAF_K) te, kad je to moguće, granice pouzdanosti svih tih parametara izračunavaju se iz jednadžbi kompjutoriziranog modela (za modele vidi Dodatak 2.). Ispravnost usklađenosti bilo kojeg modela može se odrediti iz koeficijenta korelacije ili koeficijenta određivanja (koeficijenti blizu jedinice znak su dobre usklađenosti).

20. Da bi se smanjila varijabilnost rezultata ispitivanja za organske tvari visoke lipofilnosti, faktore bioakumulacije potrebno je dodatno izraziti u odnosu na sadržaj lipida ispitivanih organizama i na sadržaj organskog ugljika (TOC) u sedimentu (faktor akumulacije biota-sediment ili BSAF kg sedimenta TOC kg^{-1} sadržaja lipida u crvima). Ovaj pristup temelji se na iskustvima i teoretskim korelacijama za vodeni odjeljak kada za neke kemijske razrede postoji jasna veza između potencijala tvari za bioakumulaciju i njezine lipofilnosti, koja je dobro poznata za ribe kao organizme modele (14)(25)(27). Postoji i veza između sadržaja lipida u ispitivanim ribama i opažene bioakumulacije takvih tvari. Slične su korelacije utvrđene i za bentičke organizme (15)(16)(17)(18). Ako je na raspolaganju dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida pokusnih životinja može se odrediti na istom biološkom materijalu upotrijebljenom za određivanje koncentracije ispitivane tvari. Međutim, praktično je upotrebljavati aklimatizirane kontrolne životinje barem na početku ili po mogućnosti na kraju faze apsorpcije za mjerenje sadržaja lipida, što se potom može iskoristiti za normalizaciju vrijednosti BAF-a.

VALJANOST ISPITIVANJA

21. Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

— Kumulativna smrtnost crva (kontrolnih i ispitnih) do kraja ispitivanja ne bi trebala premašiti 20 % od početnog broja.

— Dodatno, potrebno je dokazati da crvi ruju u sedimentu kako bi omogućili maksimalno izlaganje. Za detalje vidi stavak 28.

▼M6

OPIS METODE

Ispitne vrste

22. Nekoliko se vrsta vodenih oligoheta može upotrijebiti za ispitivanje. Najčešće upotrebljavane vrste popisane su u Dodatku 6.

23. Testove toksičnosti (96 sati, samo u vodi) potrebno je provoditi u redovitim razmacima (primjerice svakog mjeseca) s referentnom toksičnom tvari, poput kalijeva klorida (KCl) ili bakrova sulfata ($CuSO_4$) (1) radi dokazivanja zdravstvenih stanja pokusnih životinja (1) (69. Ako se referentni testovi toksičnosti ne provode u redovitim intervalima, potrebno je provjeriti šaržu organizama koja će se upotrebljavati u ispitivanju bioakumulacije sedimenta s pomoću referentne toksične tvari. I mjerenje sadržaja lipida može pružiti korisne informacije o stanju životinja.

Kultura ispitnih organizama

24. Kako bi se osigurao dovoljan broj crva za provođenje ispitivanja bioakumulacije, crvi se mogu čuvati u trajnoj laboratorijskoj kulturi jedne vrste. Metode laboratorijske kulture za odabrane ispitne vrste sažete su u Dodatku 6. Za detalje vidi reference (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Aparatura

25. Potrebno je pobrinuti se da se za sve dijelove opreme izbjegava upotreba materijala koji mogu otapati, apsorbirati ispitivane tvari ili propuštati ostale tvari te koji imaju negativan učinak na pokusne životinje. Standardne pravokutne ili cilindrične posude od kemijski inertnog materijala prikladne zapremine mogu se upotrebljavati u skladu s brzinom punjenja, odnosno brojem ispitnih crva. Potrebno je izbjegavati upotrebu mekanih plastičnih cijevi za davanje vode ili zraka. Za svu opremu koja dolazi u doticaj s ispitnim medijem potrebno je upotrebljavati politetrafluoroetilen, nehrđajući čelik /ili staklo. Za tvari s visokim koeficijentima apsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, možda će biti potrebno silanizirano staklo. U tim situacijama oprema će se morati baciti nakon upotrebe (5). Kad je riječ o radioaktivno obilježenim ispitivanim tvarima i hlapljivim tvarima, potrebno je pobrinuti se da se izbjegne stripiranje i oslobađanje stripirane ispitivane tvari. Potrebno je upotrebljavati zamke (primjerice staklene posude za pranje plinova) koje sadržavaju odgovarajuće apsorbente kako bi se zadržali svi ostaci koji isparavaju iz ispitnih posuda (11).

Voda

26. Kakvoća vode iznad sedimenta mora omogućavati preživljavanje ispitne vrste tijekom razdoblja aklimatizacije i ispitivanja bez pojave anomalija u izgledu i ponašanju riba. U skladu s ispitnom metodom C.1. (25) u ispitivanjima kao i u laboratorijskim kulturama crva preporučuje se upotreba obrađene vode kao vode iznad sedimenta. Dokazano je da nekoliko ispitnih vrsta u toj vodi (8) može preživjeti, rasti i razmnožavati se te je omogućena maksimalna standardizacija uvjeta ispitivanja i kulture. Potrebno je zabilježiti barem s obzirom na pH-vrijednost, provodljivost i tvrdoću vode. Analiza vode na onečišćujuće mikrotvari prije upotrebe mogla bi pružiti korisne informacije (Dodatak 4.).

27. Tijekom razdoblja ispitivanja voda bi trebala biti stalne kakvoće. pH-vrijednost vode iznad sedimenta trebala bi biti između šest i devet. Ukupna tvrdoća na početku ispitivanja trebala bi biti između 90 i 400 mg $CaCO_3$ po litri (7). Rasponi za pH-vrijednost i tvrdoću u spomenutoj obrađenoj vodi

▼M6

navedeni su u ispitnoj metodi C.1. (25). Ako se sumnja u postojanje interakcije između iona tvrdoće i ispitivane tvari, potrebno je upotrebljavati vodu manje tvrdoće. U Dodatku 4. sažeti su dodatni kriteriji prihvatljive vode za razrjeđivanje u skladu sa Smjernicom za ispitivanje OECD-a TG 210 (34).

Sediment

28. Kakvoća sedimenta mora omogućiti preživljavanje i, po mogućnosti, razmnožavanje ispitnih organizama tijekom trajanja aklimatizacije i razdoblja ispitivanja, a da pritom oni ne pokazuju nikakav neuobičajen izgled ili ponašanje. Crvi bi trebali rovati u sedimentu. Ponašanje pri rovanju može utjecati na izlaganje i, posljedično, na BAF. Stoga je, gdje zamućenost vode iznad sedimenta dopušta takva promatranja, potrebno zabilježiti izbjegavanje sedimenta ili ponašanje pri rovanju ispitnih organizama. Crvi (kontrolni i ispitni) trebali bi rovariti u sedimentu unutar razdoblja od 24 sata nakon dodavanja u ispitne posude. Ako se opazi trajno nerovanje ili izbjegavanje sedimenta (primjerice više od 20 % tijekom više od polovice trajanja faze apsorpcije), to je znak da ili uvjeti ispitivanja nisu prikladni ili ispitni organizmi nisu zdravi, ili da koncentracija ispitivane tvari izaziva takvo ponašanje. U takvom slučaju ispitivanje bi bilo potrebno prekinuti i ponoviti pri poboljšanim uvjetima. Dodatne informacije o konzumiranju sedimenta mogu se dobiti primjenom metoda opisanih u (35) (36) u kojima se navodi konzumiranje sedimenta ili odabir čestica u ispitnim organizmima. Ako su vidljive, potrebno je zabilježiti barem prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta na površini sedimenta koje ukazuju na to da crvi konzumiraju sediment te je navedeno potrebno razmotriti pri tumačenju rezultata ispitivanja u smislu putova izloženosti.

29. Za upotrebu i u ispitivanim i u laboratorijskim kulturama crva preporučuje se umjetni sediment na temelju umjetnog tla opisanog u ispitnoj metodi C.8. (40) (Dodatak 5.) jer prirodni sedimenti odgovarajuće kvalitete možda neće biti dostupni tijekom cijele godine. Dodatno, na ispitivanje mogu utjecati prirodni organizmi kao i moguće prisustvo onečišćujućih mikrotvari u prirodnim sedimentima. Nekoliko ispitnih vrsta može preživjeti, rasti i razmnožavati se u umjetnom sedimentu (8).

30. Za umjetni sediment potrebno je zabilježiti barem podrijetlo sastojaka, distribuciju veličine zrna (postotak pijeska, praha i gline), sadržaj organskog ugljika (TOC), sadržaj vode i pH-vrijednost. Mjerenje redoks potencijala fakultativno je. Međutim, prirodni sedimenti s neonečišćenih mjesta mogu poslužiti kao ispitni sediment i/ili sediment kulture (1). Za prirodne sedimente potrebno je zabilježiti barem podrijetlo (mjesto skupljanja), pH-vrijednost i amonijak porne vode, sadržaj organskog ugljika (TOC), distribuciju veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline) te postotak sadržaja vode (6). Ako se očekuje stvaranje amonijaka, preporučuje se da se prirodni sediment prije dodavanja ispitivane tvari postupkom spikinga prethodno priprema sedam dana u istim uvjetima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Na kraju tog razdoblja pripreme potrebno je ukloniti i baciti vodu iznad sedimenta. Analiza sedimenta ili njegovih sastojaka na onečišćujuće mikrotvari prije upotrebe mogla bi dati korisne informacije.

Priprema

31. Rukovanje prirodnim sedimentima prije njihove upotrebe u laboratoriju opisano je u (1)(6)(44). Priprema umjetnog sedimenta opisana je u Dodatku 5.

▼M6

Skladištenje

32. Prirodni sedimenti u laboratoriju trebali bi se skladištiti čim kraće. Agencija za zaštitu okoliša SAD-a (6) preporučuje maksimalno razdoblje skladištenja od osam tjedana pri temperaturi od 4 ± 2 °C u mraku. Iznad sedimenta u spremnicima za skladištenje ne bi trebalo biti plinskog prostora. Preporuke za skladištenje umjetnog sedimenta navedene su u Dodatku 5.

Primjena ispitivane tvari

33. U sediment je postupkom spikinga dodana ispitivana tvar. Postupak spikinga obuhvaća premazivanje jednog ili većeg broja sastojaka sedimenta ispitivanom tvari. Primjerice, kremeni pijesak ili njegov dio (primjerice 10 g kremenog pijeska po ispitnoj posudi) može se namočiti u otopini ispitivane tvari u prikladnom otapalu koji onda polako isparava dok ne ostane suhi pijesak. Premazani dio potom se može umiješati u mokri sediment. Pri pripremi sedimenta u obzir se mora uzeti količina pijeska koja nastane miješanjem ispitivane tvari i pijeska, odnosno sediment je stoga potrebno pripremiti s manje pijeska (6).

34. S prirodnim sedimentom, ispitivana tvar može se dodati postupkom spikinga sušenog dijela sedimenta na prethodno opisani način za umjetni sediment ili miješanjem ispitivane tvari u vlažni sediment, uz naknadno isparavanje bilo kakva otapajućeg sredstva. Prikladna otapala za postupak spikinga jesu etanol, metanol, etilen-glikol-monometil eter, etilen-glikol-dimetil eter, dimetilformamid i trietilenglikol (5)(34). Glavni kriteriji za odabir odgovarajućeg otapajućeg sredstva trebali bi biti toksičnost i hlapljivost otapala te topljivost ispitivane tvari u odabranom otapalu. Dodatna smjernica o postupcima spikinga navedena je u dokumentu Environment Canada (1995)(41). Potrebno je pobrinuti se da se ispitivana tvar koja se dodaje u sediment temeljito i ravnomjerno raspršiu sedimentu. Potrebno je analizirati podzorke višestrukog određivanja sedimenta obrađenog postupkom spikinga kako bi se provjerile koncentracije ispitivane tvari u sedimentu te utvrdio stupanj homogenosti raspodjele ispitivane tvari.

35. Kad se pripremi sediment obrađen postupkom spikinga s vodom iznad sedimenta, poželjno je dopustiti razdiobu ispitivane tvari između sedimenta i tekućeg stanja. To je po mogućnosti potrebno učiniti u uvjetima temperature i dozračivanja koji se primjenjuju pri ispitivanju. Prikladno vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i tvar, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, pa čak u rijetkim slučajevima i do nekoliko tjedana (od četiri do pet tjedana) (28)(42). U ovom se ispitivanju ne čeka uravnoteženje, već se preporučuje vrijeme uravnoteženja od 48 sati do sedam dana. Ovisno o svrsi istraživanja, primjerice kada se oponašaju okolišni uvjeti, sediment obogaćen postupkom spikinga može biti uravnotežen ili ga se može ostaviti dulje vrijeme da stari (11).

PROVEDBA ISPITIVANJA

Preliminarno ispitivanje

36. Preliminarni eksperiment može biti koristan za optimizaciju uvjeta ispitivanja za glavno ispitivanje, primjerice odabir koncentracije, odnosno koncentracija ispitivane tvari, trajanje faze apsorpcije i izlučivanja. Tijekom preliminarnog

▼M6

ispitivanja potrebno je promatrati i bilježiti ponašanje crva, primjerice izbjegavanje sedimenta, odnosno bijeg crva iz sedimenta, koje može biti prouzročeno ispitivanom tvari i/ili samim sedimentom. Izbjegavanje sedimenta u preliminarnom se ispitivanju može upotrijebiti kao subletalni parametar za procjenu koncentracije(a) ispitivane tvari koja će se upotrijebiti u ispitivanju bioakumulacije.

Uvjeti izloženosti

Trajanje faze apsorpcije

37. Ispitni organizmi izlažu se ispitivanoj tvari tijekom faze apsorpcije. Prvi je uzorak potrebno uzeti između četiri i 24 sata nakon početka faze apsorpcije. Faza apsorpcije trebala bi trajati do 28 dana (1)(6)(11), osim ako se može dokazati da je ravnoteža uspostavljena prije toga. Stabilno stanje postiže se kada: (i) je graf faktora bioakumulacije u svakom razdoblju uzorkovanja u ovisnosti o vremenu paralelan s vremenskom osi; (ii) se tri uzastopne analize BAF-a provedene na uzorcima uzetima u razmacima od najmanje dva dana ne razlikuju više od ± 20 % i (iii) ne postoje velike razlike između triju razdoblja uzorkovanja (na temelju statističkih usporedbi, primjerice analize varijance, regresijske analize). Ako se do 28. dana ne postigne stabilno stanje, faza apsorpcije može se završiti pokretanjem faze eliminacije, a BAF_K može se izračunati iz konstanta apsorpcije i brzine eliminacije (vidi i stavke od 16. do 18.).

Trajanje faze eliminacije

38. Prvi je uzorak potrebno uzeti između četiri i 24 sata nakon početka faze eliminacije jer tijekom početnog razdoblja može doći do brzih promjena u ostacima u tkivu. Preporučuje se prekinuti fazu eliminacije ili kada je koncentracija ispitivane tvari niža od 10 % koncentracije stabilnog stanja ili nakon maksimalnog trajanja od deset dana. Razina ostataka u crvima na kraju faze eliminacije prijavljuje se kao sekundarni krajnji rezultat. Međutim, to razdoblje može biti uvjetovano razdobljem tijekom kojeg se koncentracija ispitivane tvari u crvima zadržava iznad analitičke granice detekcije.

Ispitni organizmi

Broj ispitnih crva

39. Broj crva po uzorku mora pružiti masu tkiva crva tako da masa ispitivane tvari po uzorku na početku faze apsorpcije, odnosno na kraju faze eliminacije bude znatno viša od granice detekcije za ispitivanu tvar u biološkom materijalu. U navedenim je fazama apsorpcije i eliminacije koncentracija u pokusnim životinjama obično relativno niska (6)(8)(18). Budući da je pojedinačna masa brojnih vrsta vodenih oligoheta vrlo niska (od pet do deset miligrama mokre mase po jedinci za vrste *Lumbriculus variegatus* i *Tubifex tubifex*), mogu se pridružiti i crvi iz ispitnih posuda za višestruka određivanja za vaganje i analizu ispitivane kemikalije. Za ispitne vrste više pojedinačne mase (primjerice *Branchiura sowerbyi*) mogu se upotrebljavati višestruka određivanja koja sadržavaju jednu jedinku, no u tim je slučajevima potrebno povećati broj višestrukih određivanja na pet po mjestu uzorkovanja (11). Međutim, potrebno je napomenuti da vrsta *B. sowerbyi* nije bila uključena u prstenasti test (12) te da se stoga ne preporučuje kao preferirana vrsta u metodi.

40. Potrebno je upotrebljavati crve slične veličine (za vrstu *L. variegatus* vidi Dodatak 6.). Trebali bi biti iz istog izvora te bi kao odrasle ili velike životinje trebali pripadati istom starosnom razredu (vidi Dodatak 6.). Budući da masa i starost životinje mogu znatno utjecati na vrijednosti BAF-a (primjerice zbog različitog sadržaja lipida i/ili prisutnosti jajašaca), te parametre potrebno je točno zabilježiti. Prije početka ispitivanja potrebno je izvagati poduzorak crva kako bi se izvagala srednja mokra i suha masa.

▼M6

41. Kad je riječ o vrstama *Tubifex tubifex* i *Lumbriculus variegatus*, očekuje se da će tijekom ispitnog razdoblja doći do razmnožavanja. Potrebno je zabilježiti izostanak razmnožavanja u ispitivanju bioakumulacije te to razmotriti pri tumačenju rezultata ispitivanja.

Punjenje

42. Potrebno je upotrijebiti visoke omjere sediment-crv i voda-crv kako bi se minimiziralo smanjenje koncentracije ispitivane tvari u sedimentu tijekom faze apsorpcije te kako bi se izbjegla smanjenja u koncentraciji otopljenog kisika. Odabrana brzina punjenja trebala bi odgovarati prirodno nastalim gustoćama naseljenosti odabrane vrste (43). Primjerice, za vrstu *Tubifex tubifex* preporučuje se brzina punjenja od jednog do četiriju miligrama tkiva crva (mokra masa) po gramu mokrog sedimenta (8)(11). Za vrstu *L. variegatus* reference (1) i (6) preporučuju brzina punjenja od $\leq$ 1 g suhe mase tkiva crva po 50 g organskog ugljika sedimenta.

43. Crvi koji će se upotrebljavati u ispitivanju uklanjaju se iz kulture prosijavanjem kulture sedimenta. Životinje (odrasli ili veliki crvi bez znakova nedavne fragmentacije) prenose se u staklene zdjelice (primjerice Petrijeve zdjelice) s čistom vodom. Ako se uvjeti ispitivanja razlikuju od uvjeta uzgoja kulture, trebala bi biti dovoljna faza aklimatizacije od 24 sata. Prije vaganja iz crva je potrebno odstraniti višak vode. To se može učiniti nježnim stavljanjem crva na prethodno navlažen papirnati ručnik. Za sušenje crva ne preporučuje se upotreba upijajućeg papira jer može prouzročiti stres crva ili ih oštetiti. Brunson *et al.* (1998.) preporučuju upotrebu crva iz kojih nije uklonjen višak tekućine koji predstavljaju približno 1,33 puta ciljane biomase. Tih dodatnih 33 % odgovara razlici između crva iz kojih je uklonjen višak tekućine i onih iz kojih to nije učinjeno (28).

44. Na početku faze apsorpcije (0. dan ispitivanja) ispitni se organizmi uklanjaju iz aklimatizirane komore te se nasumično raspoređuju po posudama (primjerice Petrijevim zdjelicama) koje sadržavaju obrađenu vodu dodavanjem skupina od po dva crva u svaku posudu sve dok u svakoj posudi ne bude deset crva. Svaka od tih skupina crvi potom se nasumično prenosi u zasebne ispitne posude, primjerice s pomoću hvataljka od mekog željeza). Ispitne posude potom se inkubiraju u skladu s uvjetima ispitivanja.

Hranjenje

45. S obzirom na nizak hranjivi sadržaj umjetnog sedimenta, sediment je potrebno obogatiti izvorom hrane. Kako se ne bi podcijenila izloženost ispitnih organizama, primjerice selektivnim hranjenjem nekontaminiranom hranom, hranu potrebnu za razmnožavanje i rast ispitnih organizama potrebno je dodati sedimentu jednom prije ili tijekom primjene ispitivane tvari (vidi Dodatak 5.).

Omjer sedimenta i vode

46. Preporučeni je omjer sedimenta i vode 1: 4 (45). Ovaj se omjer smatra stabilnim za održavanje koncentracija kisika na primjerenim razinama te za izbjegavanje stvaranja amonijaka u vodi iznad sedimenta. Sadržaj kisika u vodi iznad sedimenta potrebno je održavati na razini od $\geq$ 40 % zasićenosti. Voda iznad sedimenta u ispitnim posudama trebala bi se lagano dozračivati (primjerice dva do četiri mjehurića po sekundi) Pasteurovom pipetom smještenom približno dva centimetra iznad površine sedimenta kako bi se minimiziralo uznemiravanje sedimenta.

▼M6

Svjetlo i temperatura

47. Fotoperiod u kulturi i ispitivanju jest 16 sati (1)(6). Intenzitet svjetla u ispitnom području potrebno je održavati na otprilike 500 – 1 000 lx. Temperatura bi trebala iznositi 20 ± 2 °C tijekom cijelog ispitivanja.

Ispitne koncentracije

48. Za utvrđivanje kinetike apsorpcije upotrebljava se jedna ispitna koncentracija (što je moguće niža), no može se upotrijebiti druga (viša) koncentracija (primjerice (46)). Uzorci se u tom slučaju uzimaju i analiziraju u stabilnom stanju ili nakon 28 dana kako bi se potvrdio BAF izmjeren pri nižoj koncentraciji (11). Potrebno je izabrati višu koncentraciju kako bi se mogli isključiti štetni učinci (primjerice odabirom približno 1 % najniže poznate koncentracije s vidljivim kroničnim učinkom EC_x dobivenim iz relevantnih studija kronične toksičnosti). Niža ispitna koncentracija trebala bi biti znatno viša od granice detekcije u sedimentu i biološkim uzorcima iz primijenjene analitičke metode. Ako je koncentracija s vidljivim učinkom ispitivane kemikalije blizu granice analitičke detekcije, preporučuje se upotreba radioaktivno obilježene ispitne kemikalije visoke specifične radioaktivnosti.

Ispitna i kontrolna višestruka određivanja

49. Najmanji broj ispitnih višestrukih određivanja za kinetička mjerenja trebao bi biti tri po mjestu uzorkovanja (11) tijekom faze apsorpcije i eliminacije. Potrebno je upotrijebiti dodatna višestruka određivanja, primjerice za fakultativne dodatne datume uzorkovanja. Za fazu eliminacije pripremljen je odgovarajući broj višestrukih određivanja sa sedimentom koji nije obrađen postupkom spikinga i vodom iznad sedimenta kako bi se ispitni crvi na kraju faze apsorpcije mogli prebaciti iz određenih ispitnih posuda u neispitne posude. Ukupan broj ispitnih višestrukih određivanja trebao bi biti dovoljan i za fazu apsorpcije i za fazu eliminacije.

50. Alternativno, crvi koji su tijekom faze eliminacije određeni za uzorkovanje mogu biti izloženi u jednom velikom spremniku sa sedimentom koji je podvrgnut postupku spikinga iste šarže koja je upotrijebljena za kinetiku apsorpcije. Potrebno je dokazati da su uvjeti ispitivanja (primjerice dubina sedimenta, omjer sedimenta i vode, dodavanje, temperatura, kvaliteta vode) usporedivi s višestrukim određivanjima određenima za fazu apsorpcije. Na kraju faze apsorpcije iz ovog je spremnika potrebno uzeti uzorke vode, sedimenta i tla za analizu. Potrebno je pozorno ukloniti dovoljan broj velikih crva koji ne pokazuju znakove nedavne fragmentacije te ih premjestiti u višestruka određivanja pripremljena za fazu eliminacije (primjerice deset organizama po posudi za višestruko određivanje).

51. Ako se osim vode ne upotrebljava drugo otapalo, za biološku i pozadinsku analizu potrebno je osigurati najmanje devet višestrukih određivanja iz negativne kontrole (najmanje tri uzorkovana na početku, tri na kraju apsorpcije i tri na kraju eliminacije). Ako je za primjenu ispitivane tvari upotrijebljeno bilo kakvo otapajuće sredstvo, potrebno je oformiti kontrolnu skupinu s otapalom (najmanje tri višestruka određivanja trebala bi biti uzorkovana na početku, tri na kraju apsorpcije i tri na kraju eliminacije) U tom slučaju potrebno je pružiti najmanje četiri višestruka određivanja iz negativne kontrole (bez otapala) za uzorkovanje na kraju faze apsorpcije. Ta se višestruka određivanja mogu biološki usporediti s kontrolnim skupinama s otapalom da bi se dobile informacije o mogućem utjecaju otapala na ispitne organizme. Detalji su navedeni u Dodatku 3.

▼M6

Učestalost mjerenja kakvoće vode

52. Tijekom faze apsorpcije i eliminacije u vodi iznad sedimenta potrebno je mjeriti barem sljedeće parametre kakvoće vode:

temperatura	u jednoj posudi svake razine ispitivanja po datumu uzorkovanja i u jednoj kontrolnoj posudi jednom tjedno te na početku i na kraju razdoblja apsorpcije i eliminacije; može se i zabilježiti temperatura u mediju koji okružuje (vanjski zrak ili vodena kupelj) ili u jednoj reprezentativnoj ispitnoj posudi, primjerice kontinuirano ili u intervalima po satima;
sadržaj otopljenog kisika	u jednoj posudi svake razine ispitivanja i u jednoj kontrolnoj posudi po datumu uzorkovanja; izražen kao mg/l i % ASV-a (vrijednosti zasićenosti kisikom);
dovod zraka	kontrolira se najmanje jednom dnevno (za radnih dana) i prilagođava se po potrebi;
pH-vrijednost	u jednoj ispitnoj posudi svake razine ispitivanja po datumu uzorkovanja i u jednoj kontrolnoj posudi jednom tjedno te na početku i na kraju razdoblja apsorpcije i eliminacije;
ukupna tvrdoća vode	barem u jednoj ispitnoj posudi i jednoj kontrolnoj ispitnoj posudi na početku i kraju razdoblja apsorpcije i eliminacije, izraženo kao mg/l $CaCO_3$;
ukupni sadržaj amonijaka	barem u jednoj ispitnoj posudi i jednoj kontrolnoj ispitnoj posudi na početku i kraju razdoblja apsorpcije i eliminacije, izraženo kao mg/l NH_4^+ ili NH_3 ili ukupni amonijak – N.

Uzorkovanje i analiza crva, sedimenta i vode

Raspored uzorkovanja

53. Primjeri rasporeda uzorkovanja za fazu apsorpcije od 28 dana i fazu eliminacije od deset dana nalaze se u Dodatku 3.

54. Uzorkujte vodu i sediment iz ispitnih posuda za određivanje koncentracije ispitivane tvari prije umetanja crva te tijekom faze apsorpcije i faze eliminacije. Tijekom ispitivanja utvrđuju se koncentracije ispitivane tvari u crvima, sedimentu i vodi kako bi se nadzirala distribucija ispitivane tvari u segmentima ispitnog sustava.

55. Crve, sediment i vodu uzorkujte u najmanje šest prigoda tijekom faze apsorpcije kao i eliminacije.

56. Nastavite s uzorkovanjem sve dok se ne postigne plato (stabilno stanje) (vidi Dodatak 1.) ili 28 dana. Ako se unutar 28 dana ne postigne plato, počnite s fazom eliminacije. Pri započinjanju faze eliminacije određene crve prenesite u posude za višestruko određivanje koje sadržavaju netretirani sediment i vodu (vidi i stavke 17. i 18.).

Uzorkovanje i priprema uzoraka

57. Uzorke vode dobijte procjeđivanjem, ispuštanjem ili pipetiranjem volumena koji je dovoljan za mjerenje količine ispitne tvari u uzorku.

58. Preostala voda iznad sedimenta pozorno se procjeđuje ili ispušta iz ispitne(ih) posude(a). Uzorke sedimenta potrebno je uzimati pozorno, uz minimalno ometanje crva.

▼M6

59. Uklonite sve crve iz ispitnih višestrukih određivanja u vrijeme uzorkovanja, primjerice suspendiranjem sedimenta s vodom iznad sedimenta i rasprostiranjem sadržaja svakog višestrukog određivanja u plitkoj posudi te vađenjem crva hvataljkom od mekog željeza. Brzo ih isperite vodom u plitkoj staklenoj ili čeličnoj plitici. Uklonite višak vode. Crve pozorno prenesite u prethodno izvaganu posudu i izvažite ih. Crve usmrtite zamrzavanjem (primjerice ≤ – 18 °C). Potrebno je zabilježiti prisutnost i broj kokona i/ili mladih.

60. Općenito, crve je potrebno izvagati i usmrtiti odmah nakon uzorkovanja, bez faze pražnjenja crijeva, kako bi se dobio konzervativni BAF koji obuhvaća onečišćeni sadržaj crijeva te kako bi se izbjegli gubici tjelesnih ostataka tijekom razdoblja pražnjenja crijeva samo u vodi (8). Tijekom bilo kojeg razdoblja pražnjenja crijeva samo u vodi ne očekuje se znatna eliminacija tvari čiji je log K_{ow} iznad pet, dok može doći do gubitka znatnih količina tvari čiji je log Kow niži od četiri (47).

61. Tijekom faze eliminacije crvi prazne crijeva u čistom sedimentu. To znači da mjerenja odmah nakon faze eliminacije uključuju kontaminirani sediment crijeva, dok se pretpostavlja da se kontaminirani sadržaj crijeva nakon početnih četiri do 24 sata faze eliminacije zamjenjuje čistim sedimentom (11) (47). Koncentracija u crvima u ovom uzorku tada se može smatrati koncentracijom tkiva nakon pražnjenja crijeva. Kako bi se u obzir uzelo i razrjeđivanje koncentracije ispitivane tvari u nekontaminiranom sedimentu tijekom faze eliminacije, masa sadržaja crijeva može se procijeniti iz omjera mokre mase crva / mase praha crva ili iz suhe mase crva / mase praha crva.

62. Ako je svrha specifičnog istraživanja izmjeriti bioraspoloživost i ostatke pravog tkiva u ispitnim organizmima, tada je barem poduzorak ispitnih životinja (primjerice iz triju dodatnih posuda za višestruko određivanje) koji je, po mogućnosti, uzorkovan tijekom stabilnog stanja, potrebno izvagati, pročišćivati u čistoj vodi šest sati (47) i ponovno izvagati prije analize. Tada se podaci o masi i tjelesnoj koncentraciji crva ovog poduzorka mogu usporediti s vrijednostima dobivenima od nepročišćenih crva. Crve određene za mjerenje eliminacije potrebno je pročistiti prije prijenosa u čisti sediment kako bi se za životinje minimizirao dodatni stres.

63. Po mogućnosti, uzorke vode, sedimenta i crva analizirajte neposredno nakon njihova vađenja (odnosno u roku od jednog do dva dana) kako bi se spriječila razgradnja ili ostali gubici te kako bi se izračunale približne brzine apsorpcije i eliminacije tijekom nastavka ispitivanja. Osim toga, trenutačnom se analizom izbjegava kašnjenje u određivanju platoa.

64. Ako se analiza ne obavi odmah, uzorke je potrebno uskladištiti pod prikladnim uvjetima. Prije početka istraživanja pribavite informacije o stabilnosti i ispravnim uvjetima skladištenja za određenu ispitivanu tvar (primjerice trajanje i temperatura skladištenja, postupci ekstrakcije itd.). Ako takve informacije nisu dostupne te ako se procijeni da su nužne, istodobno se mogu analizirati kontrolna tkiva podvrgnuta postupku spikinga kako bi se utvrdila stabilnost skladištenja.

Kakvoća analitičke metode

65. Budući da čitav postupak uglavnom ovisi o točnosti, preciznosti i osjetljivosti analitičke metode koja se primjenjuje u odnosu na ispitivanu tvar, pokusima treba provjeriti jesu li preciznost i obnovljivost kemijske analize te izdvajanje ispitivane tvari iz uzoraka vode, sedimenta i crva zadovoljavajući za metodu u pitanju. Provjerite i može li se ispitivana tvar detektirati u

▼M6

kontrolnim posudama u koncentracijama višima od pozadinskih. Ako je to potrebno, ispravite vrijednosti C_w, C_s i C_a za oporavke i pozadinske vrijednosti kontrola. Tijekom ispitivanja svim uzorcima rukujte na način da minimizirate kontaminaciju i gubitak (primjerice nastali kao rezultat adsorpcije ispitivane tvari na uređaj za uzorkovanje).

66. Potrebno je zabilježiti i u izvješće uključiti i ukupni oporavak te oporavak ispitivane tvari u crvima, sedimentu, vodi te, ako se upotrebljavaju, u zamkama koje sadržavaju apsorbente radi zadržavanja isparene ispitivane tvari.

67. Budući da se preporučuje upotreba radioaktivno obilježenih tvari, moguće je analizirati cjelokupnu radioaktivnost (odnosno polazni i produkti razgradnje). Međutim, ako je to analitički izvedivo, korisne informacije može pružiti kvantifikacija polazne tvari i produkata razgradnje u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije. Ako je predviđeno provođenje takvih mjera, tada je uzorke potrebno podvrgnuti odgovarajućim postupcima ekstrakcije kako bi se polazna tvar mogla zasebno kvantitativno odrediti. Kada uočeni produkt razgradnje predstavlja znatan postotak (primjerice > 10 %) radioaktivnosti izmjerene u ispitnim organizmima u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije, preporučuje se identificirati takve produkte razgradnje (5).

68. Zbog niske pojedinačne biomase često nije moguće utvrditi koncentraciju ispitivane tvari u svakom pojedinom crvu, osim ako se kao ispitivana vrsta ne upotrebljava Branchiura sowerbyi (40 – 50 mg mokre mase po crvu) (11). Stoga je udruživanje jedinki uzorkovanih iz dane ispitne posude prihvatljivo, ali ograničava statističke postupke koji se mogu primijeniti na podatke. Ako su određeni statistički postupak i snaga bitni, u ispitivanje je potrebno uključiti dovoljan broj pokusnih životinja i/ili broj posuda za višekratno određivanje kako bi se omogućilo željeno spajanje, postupak i snaga.

69. Preporučuje se BAF izražavati i kao funkciju ukupne mokre mase i, kad je to potrebno (primjerice za jako lipofilne tvari), kao funkciju sadržaja lipida i TOC-a sedimenta. Za određivanje sadržaja lipida potrebno je upotrebljavati prikladne metode (48)(49). Ekstrakcijski postupak kloroform-metanol (50) može se preporučiti kao standardna metoda (48). Međutim, radi izbjegavanja upotrebe kloriranih otapala može se upotrebljavati metoda Bligha i Dyera izmijenjena u prstenastom testu (50) kako je opisano u (51). Budući da razne metode ne daju identične vrijednosti (48), vrlo je važno navesti pojedinosti primijenjene metode. Kad je to moguće, odnosno ako postoji dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida mjeri se na istom uzorku ili ekstraktu kao i onaj proizveden za analizu ispitivane tvari jer se lipidi često moraju ukloniti iz ekstrakta prije nego što se on kromatografski analizira (5). Međutim, praktično je upotrebljavati aklimatizirane kontrolne životinje barem na početku ili po mogućnosti na kraju faze apsorpcije za mjerenje sadržaja lipida, odnosno u trima uzorcima.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

70. Krivulja apsorpcije ispitivane tvari dobiva se grafičkim prikazom koncentracije u/na crvima tijekom faze apsorpcije u ovisnosti o vremenu na

▼M6

aritmetičkoj ljestvici. Ako je krivulja dosegnula plato, izračunajte BAF_{ss} u stabilnom stanju:

$$\frac{C_a \text{pri stabilnom stanju ili 28. dana (srednja vrijednost)}}{C_s \text{pri stabilnom stanju ili 28. dana (srednja vrijednost)}}$$

71. Odredite faktor kinetičke bioakumulacije (BAFK) kao omjer ks/ke. Konstanta eliminacije (ke) obično se određuje iz krivulje eliminacije (odnosno grafičkog prikaza koncentracije ispitivane tvari u crvima tijekom faze eliminacije). Potom se izračunava konstanta brzine apsorpcije ks iz krivulje kinetike apsorpcije. Za dobivanje BAFK i konstanti brzine, ks, i ke prednost se daje metodama upotrebe procjene nelinearnih parametara na računalu (vidi Dodatak 2.). Ako eliminacija očito nije prvog reda, potrebno je primijeniti kompleksnije modele (25)(27)(52).

72. Faktor akumulacije biota-sedimenta (BSAF) određuje se normaliziranjem BAFK-a za sadržaj lipida u crvima i za ukupni sadržaj organskog kisika u sedimentu.

Tumačenje rezultata

73. Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije ispitnih koncentracija kreću u blizini granice detekcije upotrijebljene analitičke metode.

74. Jasno definirane krivulje apsorpcije i eliminacije znak su dobre kakvoće podataka o bioakumulaciji. Granice pouzdanosti za vrijednosti BAF iz dobro osmišljenih studija općenito ne bi trebale premašivati 25 % (5).

Izvješće o ispitivanju

75. Izvješće o ispitivanju mora obuhvaćati sljedeće informacije:

Ispitivana tvar

— fizikalna narav i fizikalno-kemijska svojstva, primjerice log K_{ow}, topljivost u vodi;

— podaci za identifikaciju kemikalije, izvor ispitivane tvari, identitet i koncentracija upotrijebljenog otapala;

— kod radioaktivno obilježenih tvari: točan položaj obilježenih atoma, specifična radioaktivnost i postotak radioaktivnosti povezan s nečistoćama.

Ispitivane vrste

— znanstveni naziv, soj, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, starost, red veličina itd.

Uvjeti ispitivanja

— ispitni postupak (primjerice statički, polustatički ili protočni);

— vrsta i svojstva korištene rasvjete i fotoperiod/fotoperiodi;

— plan ispitivanja (primjerice broj, materijal i veličina ispitnih posuda, volumen vode, masa i volumen sedimenta, brzina izmjene volumena vode (za protočne ili polustatičke postupke), bilo kakvo dozračivanje upotrijebljeno prije ili tijekom ispitivanja, broj višestrukih određivanja, broj crva po višestrukom određivanju, broj ispitnih koncentracija, dužina faza apsorpcije i eliminacije, učestalost uzorkovanja);

▼M6

— metoda pripreme i primjene ispitivane tvari kao i obrazloženje odabira specifične metode;

— nazivne ispitne koncentracije;

— izvor sastojaka umjetne vode i sedimenta ili, ako se upotrebljavaju prirodni mediji, podrijetlo tla, opis svake prethodne obrade, rezultati svake demonstracije sposobnosti pokusnih životinja da žive i/ili se reproduciraju u upotrijebljenom mediju, značajke sedimenta (pH-vrijednost i amonijak porne vode (prirodni sedimenti), sadržaj organskog ugljika (OC), distribucija veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), postotak sadržaja vode i sva ostala mjerenja) te značajke vode (pH-vrijednost, tvrdoća, provodljivost, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri) i sva ostala mjerenja);

— nominalna i izmjerena suha masa u % mokre mase (ili omjer suhe i mokre mase) umjetnog sedimenta; izmjerena suha masa u % mokre mase (ili omjer suhe i mokre mase) za terenske sedimente;

— kakvoća vode unutar ispitnih posuda karakterizirana temperaturom, pH-vrijednošću, amonijakom, ukupnom tvrdoćom i koncentracijom otopljenog kisika;

— detaljni podaci o tretiranju uzoraka vode, sedimenta i crva, uključujući i pojedinosti o pripremi, skladištenju, postupcima spikinga, ekstrakcijskim i analitičkim postupcima (i preciznosti) za ispitivanu tvar i sadržaj lipida te oporavak ispitivane tvari.

Rezultati

— smrtnost kontrolnih crva i crva u svakoj ispitnoj posudi te svi opaženi subletalni učinci, uključujući neuobičajeno ponašanje (primjerice izbjegavanje sedimenta, prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta, nedostatak razmnožavanja);

— izmjerena suha masa u % mokre mase tla (ili omjer suhe i mokre mase) sedimenta i ispitivanih organizama (korisno za normalizaciju);

— sadržaj lipida crvi;

— krivulje koje pokazuju kinetiku apsorpcije i eliminacije ispitivane tvari u crvima i vrijeme do stabilnog stanja;

— C_a, C_s i C_w (sa standardnim odstupanjem i rasponom, prema potrebi) za sva vremena uzorkovanja (C_a izražen u g kg^{-1} mokre i suhe mase čitavog tijela, C_s izražen u g kg^{-1} mokre i suhe mase sedimenta te C_w u mg l^{-1}). Ako se traži i faktor akumulacije biota-sedimenta (BSAF; za definicije vidi Dodatak 1.) (primjerice radi usporedbe rezultata dvaju ili većeg broja ispitivanja provedenih sa životinjama različitog sadržaja lipida), C_a trebao bi se dodatno izraziti kao g kg^{-1} sadržaja lipida u organizmu, a C_s trebao bi se izraziti kao g kg^{-1} organskog ugljika (OC) u sedimentu;

— BAF (izražen u kg mokrog sedimenta kg^{-1} mokrog crva), konstanta brzine apsorpcije sedimenta k_s (izražena u g mokrog sedimenta kg^{-1} mokrog crva d^{-1}) i konstanta brzine eliminacije k_e (izražena u d^{-1}); naknadno se može izvijestiti o BSAF-u (izražen u kg OC-a u sedimentu kg^{-1} sadržaja lipida u crvu);

▼**M6**

— Neeliminirani ostaci (NER) na kraju faze eliminacije;

— ako su mjereni: postoci polazne tvari, produkata razgradnje i vezanih ostataka (odnosno postotak ispitivane tvari koja se ne može ekstrahirati uobičajenim metodama ekstrakcije) detektirani u pokusnim životinjama;

— metode upotrijebljene za statističke analize podataka.

Ocjena rezultata

— sukladnost rezultata s validacijskim kriterijima navedenima u stavku 21.;

— neočekivani ili neobični rezultati, primjerice nepotpuna eliminacija ispitivane tvari iz pokusnih životinja; u takvim slučajevima rezultati iz bilo kojeg preliminarnog istraživanja mogu pružiti korisne informacije.

▼M6

Dodatak 1.

Definicije i jedinice

Umjetni sediment ili formulirani, obrađeni ili sintetički sediment jest smjesa tvari koja se upotrebljava za oponašanje fizikalnih sastojaka prirodnog sedimenta.

Bioakumulacija jest porast koncentracije ispitivane tvari u ili na organizmu u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u mediju koji je okružuje. Bioakumulacija nastaje i iz procesa biokoncentracije i iz procesa biomagnifikacije (vidi u nastavku teksta).

Faktor bioakumulacije (BAF) u bilo kojem trenutku tijekom faze apsorpcije ovog ispitivanja bioakumulacije jest koncentracija ispitivane kemikalije u/na ispitnom organizmu (Ca u g kg^{-1} mokre ili suhe mase) podijeljena s koncentracijom te tvari u mediju koji je okružuje (C_s kao g kg^{-1} mokre ili suhe mase sedimenta). Da bi se odnosio na jedinice C_a i C_s, BAF ima jedinice kg sedimenta kg^{-1} crva (15).

Faktori bioakumulacije izračunani izravno iz omjera konstante brzine apsorpcije sedimenta i konstante brzine eliminacije (k_s, odnosno k_e – vidi u nastavku teksta) nazivaju se faktorom kinetičke bioakumulacije (BAF_K).

Biokoncentracija jest porast koncentracije ispitivane tvari u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao izravni rezultat apsorpcije preko površine tijela, u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u okruženju.

Biomagnifikacija jest porast koncentracije ispitivane tvari u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao rezultat apsorpcije iz onečišćene hrane ili plijena, u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari u hrani ili plijenu. Biomagnifikacija može dovesti do prijenosa akumulacije ispitivane tvari unutar mreža hrane.

Faktor akumulacije biota-sediment (BSAF) jest koncentracija ispitivane kemikalije u/na ispitnom organizmu u stabilnom stanju, normalizirana lipidima, podijeljena koncentracijom ispitivane tvari u sedimentu, normaliziranom organskim ugljikom u stabilnom stanju. C_a stoga je izražen kao g kg^{-1} sadržaja lipida organizma, a C_s kao g kg^{-1} organskog sadržaja sedimenta.

Razdoblje pripremanja služi za stabilizaciju mikrobne komponente sedimenta i za uklanjanje primjerice amonijaka koji nastaje u odjeljcima sedimenta. Odvija se prije dodavanja ispitivane tvari u sediment postupkom spikinga. Voda iznad sedimenta obično se baca nakon pripremanja.

Eliminacija ispitivane tvari jest gubitak te tvari iz tkiva ispitnog organizma aktivnim ili pasivnim procesima koji se odvijaju neovisno o prisustvu ili odsustvu ispitivane tvari u mediju koji je okružuje.

Faza eliminacije jest vrijeme, nakon prijenosa ispitnih organizama iz onečišćenog medija u medij bez ispitivane tvari, tijekom kojeg se proučava eliminacija (ili neto gubitak) tvari iz ispitnih organizama.

Konstanta brzine eliminacije (k_e) jest brojčana vrijednost koja definira brzinu opadanja koncentracije ispitivane tvari u/na ispitnim organizmima nakon prijenosa ispitnih organizama iz medija koji sadržava ispitivanu tvar u medij bez te kemikalije; k_e izražava se u d^{-1}.

▼M6

Razdoblje uravnoteženja služi za omogućivanje raspodjele ispitivane tvari između krute faze, porne vode i vode iznad sedimenta. Odvija se nakon dodavanja ispitivane tvari u sediment postupkom spikinga i prije dodavanja ispitnih organizama.

Podjelni koeficijent oktanol-voda (K_{ow}) jest omjer topljivosti tvari u n-oktanolu i vodi u ravnoteži, a ponekad se izražava i kao P_{ow}. Logaritam K_{ow} (log K_{ow}) upotrebljava se kao pokazatelj potencijala tvari za bioakumulaciju vodenim organizmima.

Podjelni koeficijent organski ugljik-voda (K_{oc}) jest omjer koncentracije tvari u/na dijelu sedimenta s organskim ugljikom i koncentracije tvari u vodi u ravnoteži.

Voda iznad sedimenta jest voda koja se u ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Plato ili **stabilno stanje** definira se kao uravnoteženje između procesa apsorpcije i eliminacije koji se odvijaju istodobno tijekom faze izlaganja. Stabilno se stanje postiže na grafičkom prikazu BAF-a u svakom razdoblju uzorkovanja u ovisnosti o vremenu kada krivulja postane paralelna s vremenskom osi i kad se rezultati triju uzastopnih analiza BAF-a provedenih na uzorcima koji se uzimaju u razmacima od najmanje dva dana nalaze unutar 20 % te kad ne postoje statistički značajne razlike među trima razdobljima uzorkovanja. Za ispitivane tvari koje se sporo apsorbiraju prikladniji bi vremenski razmak bio sedam dana (5).

Porna voda ili međuprostorna voda jest voda u prostoru među česticama sedimenta ili tla.

Konstanta brzine apsorpcije sedimenta (k_s) jest brojčana vrijednost koja definira brzinu porasta koncentracije ispitivane tvari u/na ispitnom organizmu, a koja nastaje kao rezultat apsorpcije iz faze sedimenta. k_s izražava se kao g sedimenta kg^{-1} crva d^{-1}.

Sediment obrađen postupkom spikinga jest sediment u koji je dodana ispitivana tvar.

Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAF_{ss}) jest BAF u stabilnom stanju i ne mijenja se znatno tijekom duljeg razdoblja, a koncentracija ispitivane tvari u mediju koji je okružuje (C_s kao g kg^{-1} mokre ili suhe mase sedimenta) konstantna je tijekom tog razdoblja.

Faza apsorpcije ili izlaganja jest vrijeme tijekom kojeg ispitni organizmi bivaju izloženi ispitivanoj tvari.

▼M6

Dodatak 2.

Izračun parametara apsorpcije i eliminacije

Osnovni konačni učinak ispitivanja bioakumulacije jest faktor bioakumulacije, BAF. Izmjereni BAF može se izračunati dijeljenjem koncentracije u ispitnom organizmu, C_a, koncentracijom u sedimentu, C_s, u stabilnom stanju. Ako se stabilno stanje ne postigne tijekom faze apsorpcije, BAF se izračunava na isti način za 28. dan. Međutim, ipak je potrebno zabilježiti temelji li se BAF na koncentracijama u stabilnom stanju.

Preferirani način dobivanja faktora kinetičke bioakumulacije (BAF_K), konstante brzine apsorpcije sedimenta (k_s) i konstante brzine eliminacije (k_e) jest upotreba metoda procjene nelinearnih parametara na računalu. Imajući na umu vremenske serije prosječnih faktora akumulacije (C_a, srednje vrijednosti datuma svakog uzorkovanja/C_s, srednje vrijednosti datuma svakog uzorkovanja = AF) faze apsorpcije na temelju mokre mase crva i sedimenta te modela jednadžbe:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[jednadžba 1]}$$

pri čemu je AF(t) omjer koncentracije ispitivane tvari u crvima i njezina koncentracija u sedimentu u bilo kojoj danoj vremenskoj točki (t) faze apsorpcije, ti računalni programi izračunavaju vrijednosti za BAF_K, k_s i k_e.

Kad se tijekom faze apsorpcije postigne stabilno stanje (odnosno $t = \infty$), jednadžba 1 može se reducirati na:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[jednadžba 2]}$$

pri čemu je

k_s = konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g sedimenta kg^{-1} crva d^{-1}]

k_e = konstanta brzine eliminacije [d^{-1}]

Tada je $k_s/k_e \times C_s$ pristup koncentraciji ispitivane tvari u tkivu crva u stabilnom stanju ($C_{a,ss}$).

Faktor akumulacije biota-sediment (BSAF) potrebno je izračunati na sljedeći način:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

pri čemu je foc frakcija organskog ugljika u sedimentu, dok je flip frakcija lipida crva, a temelji se ili na suhoj ili na mokroj masi.

Imajući na umu vremenske serije vrijednosti koncentracije, kinetika eliminacije može se oblikovati s pomoću sljedećih modela jednadžbi i metode procjene nelinearnog parametra temeljene na računalnom izračunu.

Kao zadana početna točka preporučuje se srednji mjereni tjelesni ostatak na kraju faze apsorpcije. Potrebno je upotrebljavati samo vrijednost koja je oblikovana/procijenjena u fazi apsorpcije, primjerice ako mjerena tvar znatno odstupa od oblikovana tjelesnog ostatka. U stavku 50. pročitajte i o alternativnom prethodnom izlaganju crva određenih za eliminaciju. U ovom se pristupu smatra da uzorci tih crva prethodno izloženih 0. dana faze eliminacije pružaju realističan ostatak tijela za započinjanje kinetike eliminacije.

▼M6

Ako podaci na grafičkom prikazu u ovisnosti o vremenu naznačuju konstantni eksponencijalni pad koncentracije ispitivane tvari u životinjama, model s jednim odjeljkom (jednadžba 4) može se upotrijebiti za opis trajanja eliminacije.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[jednadžba 3]}$$

Ponekad se čini da su procesi eliminacije dvofazni i da u njima dolazi do rapidnog pada C_a tijekom početnih faza, a to se pretvara u sporiji gubitak ispitivanih tvari u kasnijim fazama eliminacije (8)(19)(25)). Te se dvije faze mogu protumačiti pretpostavkom da u organizmu postoje dva odjela iz kojih se gubi ispitivana tvar, i to različitom brzinom. U tim je slučajevima potrebno proučiti specifičnu literaturu (15)(16)(17)(25).

Opisana je eliminacija iz dvaju odjeljaka, primjerice sljedećom jednadžbom (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[jednadžba 4]}$$

A i B predstavljaju veličinu odjeljaka (u postotku cjelokupnog ostatka tkiva), pri čemu je odjeljak A onaj s brzim gubitkom tvari, a odjeljak B onaj sa sporim gubitkom tvari. Zbroj A i B jednak je 100 % cijelog volumena odjeljka životinja u stabilnom stanju. k_a i k_b predstavljaju odgovarajuće konstante eliminacije [d^{-1}]. Ako se model s dvama odjeljcima prilagodi podacima izlučivanja, konstanta brzine apsorpcije k_s može se odrediti kako slijedi (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[jednadžba 5]}$$

Unatoč tomu, ove modele jednadžbi potrebno je oprezno upotrebljavati, poglavito kada tijekom ispitivanja dođe do promjena bioraspoloživosti ispitivane tvari (42).

Kao druga mogućnost prethodno opisanom modelu jednadžbe, u istom se ispitivanju može izračunati i kinetika (k_s i k_e) primjenom kinetičkog modela prvog reda istodobno na sve podatke iz faze apsorpcije i iz faze eliminacije. Za opis metode koja bi omogućila takav kombinirani izračun konstanti brzine apsorpcije i eliminacije mogu se konzultirati reference (55), (56) i (57).

Neeliminirani ostaci (NER) trebali bi se izračunavati kao sekundarni krajnji rezultat množenjem omjera prosječne koncentracija u crvima (C_a) 10. dana faze eliminacije i prosječne koncentracija u crvima (C_a) u stabilnom stanju (28. dan faze apsorpcije) sa 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{ na kraju eliminacije}(\textit{prosjek}) \times 100}{C_a \textit{ u stabilnom stanju}(\textit{prosjek})}}$$

▼M6

Dodatak 3

Primjer rasporeda uzorkovanja za ispitivanje bioakumulacije u trajanju od 28 dana

a) **Faza apsorpcije (uključujući četverodnevnu fazu uravnoteženja)**

Dan	Djelatnosti
– 6	Pripremanje suspenzije treseta za sediment; kondicioniranje suspenzije 48 sati;
– 4	Obrada sedimenta ili frakcije sedimenta postupkom spikinga; miješanje svih sastojaka sedimenta; uklanjanje uzoraka sedimenta iz tretiranih skupina i kontrolnih skupina s otapalom radi utvrđivanja koncentracije ispitivane tvari; dodavanje vode iznad sedimenta; inkubacija u uvjetima ispitivanja (faza ujednačavanja);
– 3/– 2	Vađenje ispitnih organizama iz uzgojene kulture radi aklimatizacije;
0	Mjerenje kakvoće vode (vidi stavak 52.); uklanjanje višestrukih određivanja radi uzimanja uzoraka vode i sedimenta za određivanje koncentracije ispitivane tvari; nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude; zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva za određivanje analitičkih pozadinskih vrijednosti; kontroliranje dovoda zraka ako se upotrebljava zatvoreni sustav ispitivanja;
1	Uklanjanje višestrukih određivanja radi uzorkovanja; kontroliranje dovoda zraka, ponašanje crva, kakvoća vode (vidi stavak 56.); uzimanje uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane tvari.
2	Kontrola dovoda zraka, ponašanja crva i temperature;
3	Isto kao i 1. dan;
4 – 6	Isto kao i 2. dan;
7	Isto kao i 1. dan; nadomještanje isparene vode ako je to potrebno;
8 – 13	Isto kao i 2. dan;
14	Isto kao i 1. dan; nadomještanje isparene vode ako je to potrebno;
15 – 20	Isto kao i 2. dan;
21	Isto kao i 1. dan; nadomještanje isparene vode ako je to potrebno;
22 – 27	Isto kao i 2. dan;
28	Isto kao i 1. dan; mjerenje kakvoće vode (vidi stavak 52.); završetak faze apsorpcije, zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva radi određivanja analitičkih pozadinskih vrijednosti, mokre i suhe mase te sadržaja lipida; prenošenje crva iz preostalih izloženih višestrukih određivanja u posude koje sadržavaju čisti sediment radi faze eliminacije (nema pražnjenja crijeva); uzorkovanje vode, sedimenta i crva iz kontrolnih skupina s otapalom; uzorkovanje otapala koja zarobljavaju, ako su postavljena.
	Djelatnosti prethodnog izlaganja (faza uravnoteženja) potrebno je planirati uzimajući u obzir svojstva ispitivane tvari. Ako je to potrebno, kondicioniranje pripremljenog sedimenta pod vodom iznad sedimenta pri temperaturi od 20 ± 2 °C sedam dana; u ovom slučaju, ranija priprema sedimenta!
	Djelatnosti opisane za drugi dan potrebno je provoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

▼**M6**

b) **Faza eliminacije**

Dan	Djelatnosti
– 6	Pripremanje suspenzije treseta za sediment; kondicioniranje suspenzije 48 sati;
– 4	Miješanje svih sastojaka sedimenta; uklanjanje uzoraka sedimenta iz tretiranih skupina i kontrolnih skupina s otapalom radi utvrđivanja koncentracije ispitivane tvari; dodavanje vode iznad sedimenta; inkubacija u uvjetima ispitivanja;
0 (28. dan faze apsorpcije)	Mjerenje kakvoće vode (vidi stavak 52.); prenošenje crva iz preostalih izloženih višestrukih određivanja u posude koje sadržavaju čisti sediment; uklanjanje višestrukih određivanja nakon **četiri do šest sati** radi uzimanja uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane tvari; nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude;
1	Uklanjanje višestrukih određivanja radi uzorkovanja; kontroliranje dovoda zraka, ponašanje crva, kakvoća vode (vidi stavak 52.); uzimanje uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane tvari.
2	Kontrola dovoda zraka, ponašanja crva i temperature;
3	Isto kao i 1. dan;
4	Isto kao i 2. dan;
5	Isto kao i 1. dan;
6	Isto kao i 2. dan;
7	Isto kao i 1. dan; nadomještanje isparene vode ako je to potrebno;
8 – 9	Isto kao i 2. dan;
10	Isto kao i 1. dan; kraj faze eliminacije; mjerenje kakvoće vode (vidi stavak 52.); uzorkovanje vode, sedimenta i crva iz kontrolnih skupina s otapalom; uzorkovanje otapala koja zarobljavaju, ako su postavljena.
	Pripremu sedimenta prije početka faze eliminacije potrebno je obaviti na isti način kao i prije faze apsorpcije.
	Djelatnosti opisane za drugi dan potrebno je provoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

▼M6

Dodatak 4.

Neka fizičko-kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

SASTOJAK	KONCENTRACIJE
Čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljik	< 2μg/l
Neionizirani amonijak	< 1 μg/l
Rezidualni klor	< 10 μg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski klor	< 25 ng/l

SASTAV PREPORUČENE OBRAĐENE VODE

(a) Otopina kalcijeva klorida

Otopiti 11,76 g $CaCl_2$ 2 H_2O u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 l

(b) Otopina magnezijeva sulfata

Otopiti 4,93 g $MgSO_4$ 7 H_2O u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 l

(c) Otopina natrijeva bikarbonata

Otopiti 2,59 g $NaHCO_3$ u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 l

(d) Otopina kalijeva klorida

Otopiti 0,23 g KCl u deioniziranoj vodi; nadopuniti deioniziranom vodom do 1 l

Sve kemikalije moraju biti analitički čiste.

Provodljivost destilirane ili deioniziranoj vodi ne bi trebala premašivati10 μScm^{-1}.

Pomiješa se 25 ml svake otopine od (a) do (d) te se ukupni volumen nadopuni deioniziranom vodom do 1 l. Zbroj iona kalcija i magnezija u ovoj je otopini 2,5 mmol/l.

Omjer Ca: Mg iona jest 4: 1, dok je omjer Na: K iona 10: 1. Kapacitet kiseline $K_{S4.3}$ ove otopine jest 0,8 mmol/l.

Dozračujte vodu za razrjeđivanje dok se ne postigne zasićenost kisikom, a potom je skladištite približno dva dana bez dodatnog dozračivanja prije uporabe.

pH-vrijednost prihvatljive vode za razrjeđivanje trebala bi biti u rasponu od šest do devet.

▼M6

Dodatak 5.

Umjetni sediment – preporuke za pripremu i skladištenje

Za razliku od zahtjeva u ispitnoj metodi C.8. (40), preporučuje se da sadržaj treseta umjetnog sedimenta bude 2 % umjesto 10 % suhe mase kako bi odgovarao niskom do umjerenom organskom sadržaju prirodnih sedimenata (58).

Postotak suhih sastojaka umjetnog sedimenta:

Sastojak	Svojstva	% suhog sedimenta
Treset	Tresetnica, stupanj razgradnje: „srednji”, sušena na zraku, bez vidljivih ostataka biljke, fino usitnjen (veličina čestice ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu od 50 – 200 µm	76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	22 ± 1
Izvor hrane	Vrsta *Folia urticae*, listovi u prahu vrste *Urtica sp.* (kopriva), fino usitnjeni (veličina čestice ≤ 0,5 mm) ili mješavina listova u prahu vrste *Urtica sp.* s alfa-celulozom (1: 1); u skladu s farmakološkim standardima, za ljudsku potrošnju; dodatak suhom sedimentu	0,4 – 0,5 %
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, u prahu, kemijski čisti, dodatak suhom sedimentu	0,05 – 1
Deionizirana voda	Provodljivost ≤ 10 µS/cm, kao dodatak suhom sedimentu	30 – 50

Očekuju li se povišene koncentracije amonijaka, primjerice ako se za ispitivanu tvar zna da inhibira nitrifikaciju, može biti korisno zamijeniti 50 % koprive u prahu bogate dušikom celulozom (primjerice α-celulozom u prahu, kemijski čistom, veličina čestica ≤ 0,5 mm).

Priprema

Treset se suši na zraku te se usitnjava u fini prašak (veličina zrna ≤ 0,5 mm, bez vidljivih ostataka biljke). Suspenzija potrebne količine treseta u prahu priprema se s pomoću dijela deionizirane vode koja se dodaje suhom sedimentu (volumen vode od 11,5 x suha masa treseta koristan je za proizvodnju smjese treseta koja se može miješati (8)) s pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti.

pH-vrijednost te suspenzije podešava se do 5,5 ± 0,5 s pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se kondicionira najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizirala pH-vrijednost i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. Ponovno se mjeri pH-vrijednost i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija miješa s ostalim suhim sastojcima uzimajući u obzir bilo koji udio upotrijebljen za postupak spikinga. Dodaje se ostatak deionizirane vode kako bi se dobio homogeni sediment. Prema potrebi, ponovno se mjeri pH-vrijednost te se s $CaCO_3$ podešava od 6,5 do 7,5. Međutim, ako se očekuje stvaranje amonijaka, moglo bi biti korisno pH-vrijednost sedimenta držati ispod 7,0 (primjerice između 6,0 i 6,5). Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i sadržaj organskog ugljika. Ako se očekuje stvaranje amonijaka, umjetni se sediment može kondicionirati sedam dana pod istim uvjetima koji prevladavaju u narednom ispitivanju (primjerice omjer sedimenta i vode 1: 4, visina sloja sedimenta kao u ispitnim posudama) prije nego što mu se postupkom spikinga doda ispitivana tvar, odnosno potrebno ga je prekriti vodom koja bi trebala biti dozračena. Na kraju razdoblja kondicioniranja potrebno je ukloniti i baciti vodu iznad sedimenta. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i ukupni sadržaj organskog ugljika (primjerice tri uzorka).

▼M6

Stoga se kvarcni pijesak obrađen postupkom spikinga miješa sa sedimentom za svaku razinu obrade, sediment se razdjeljuje u ispitne posude za višestruka određivanja te se preljeva ispitnom vodom (primjerice omjer sedimenta i vode 1: 4, visina sloja sedimenta kao u ispitnim posudama). Posude se tada inkubiraju pod istim uvjetima koji prevladavaju u narednom ispitivanju. Tada počinje razdoblje ujednačavanja. Vodu iznad sedimenta potrebno je dozračiti.

Prije ili tijekom dodavanja ispitne tvari u sediment postupkom spikinga potrebno je dodati odabrani izvor hrane. U početku se može pomiješati sa suspenzijom treseta (vidi prethodno). Međutim, pretjerana degradacija izvora hrane prije dodavanja ispitivanih organizama, primjerice u slučaju dugog razdoblja ujednačavanja, može se izbjeći održavanjem razdoblja između dodavanja hrane i početka izlaganja čim kraćim. Kako bi se osigurao dovoljan kontakt s ispitivanom tvari, potrebno je izvor hrane pomiješati sa sedimentom najkasnije na dan kada se sedimentu postupkom spikinga dodaje ispitivana tvar. Iznimke se mogu učiniti kada dužina razdoblja ujednačavanja vodi do pretjerane mikrobne degradacije hrane prije dodavanja ispitivanih organizama. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suha masa i ukupni organski ugljik (primjerice tri uzorka obrađenog postupkom spikinga ili kontrolnog sedimenta).

O suhoj masi komponenata (treset, pijesak, kaolin) potrebno je izvještavati u g i u postotku ukupne suhe mase.

O volumenu vode koji se dodaje suhim komponentama tijekom pripreme sedimenta potrebno je izvijestiti i u postocima ukupne suhe mase (primjerice 100 % suhe mase + 46 % vode znači da 1 000 g suhe mase ukupno primi 460 ml vode, što rezultira s 1 460 g mokrog sedimenta.

Skladištenje

Suhi sastojci umjetnog sedimenta mogu se skladištiti na suhom, hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Pripremljeni se mokri sediment može skladištiti (za daljnju upotrebu samo u kulturi) na temperaturi od 4 ± 2 °C u mraku na razdoblje od dva do četiri tjedna od dana pripremanja (8).

Sediment u koji je ispitivana tvar dodana postupkom spikinga potrebno je upotrijebiti odmah, osim ako postoje podaci koji naznačuju da bi se taj određeni sediment mogao skladištiti, a da to nema utjecaja na toksičnost i bioraspoloživost ispitivane tvari. Tada se uzorci sedimenta obrađenog postupkom spikinga mogu skladištiti do analize u uvjetima preporučenima za određenu ispitivanu tvar.

▼M6

Dodatak 6.

Preporučene vrste oligoheta za ispitivanje bioakumulacije

***Tubifex tubifex* (MÜLLER),Tubificidae, Oligochaeta**

Tubificidni oligohet (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) živi u slatkovodnim sedimentima u cijevima obloženima sluzi. Crvi u tim cijevima obitavaju s glavom prema dolje, konzumirajući čestice sedimenta i koristeći se povezanim mikroorganizmima i organskim otpadom. Stražnji se dio obično talasa u vodi iznad sedimenta u respiracijske svrhe. Iako ova vrsta naseljava širok raspon vrsta sedimenta diljem čitave sjeverne polutke, *Tubifex tubifex* preferira relativno finu veličinu zrna (59). Prikladnost ove vrste za ekotoksikološko ispitivanje opisana je primjerice u (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metode uzgoja

Kako bi se osigurao dovoljan broj vrste *Tubifex tubifex* za provođenje ispitivanja bioakumulacije, crvi se trebaju čuvati u trajnoj laboratorijskoj kulturi. Za kulturu *T. tubifex* (8) preporučuje se sustav koji se sastoji od umjetnog sedimenta na bazi umjetnog tla u skladu s ispitnom metodom C.8. (40) i obrađene vode u skladu s ispitnom metodom C.1.

Kao posude za uzgoj kulture mogu se upotrebljavati spremnici od stakla ili nehrđajućeg čelika visine od 12 do 20 cm. Svaka posuda za uzgoj kulture puni se slojem mokrog umjetnog sedimenta pripremljenog kako je opisano u Dodatku 5. Dubina sloja sedimenta trebala bi omogućiti prirodno rovanje crva (minimalna dubina od dva cm za *T. tubifex*). Sustavu se dodaje obrađena voda. Potrebno je paziti da se minimizira miješanje sedimenta. Vodena se cjelina blago dozračuje (primjerice dva do četiri mjehurića po sekundi s 0,45 μm filtriranog zraka) Pasteurovom pipetom smještenom približno dva centimetra iznad površine sedimenta. Preporučena temperatura kulture iznosi 20 ± 2 °C.

Crvi se dodaju sustavu kulture, a maksimalno doziranje iznosi 20 000 jedinaka/m^2 površine sedimenta. Veće doziranje može prouzročiti smanjenje brzine rasta i razmnožavanja (43).

U kulturama umjetnog sedimenta crve je potrebno hraniti. Kao dodatak može se upotrebljavati prehrana koja se sastoji od fino usitnjene hrane za ribu, primjerice TetraMin® (8); Klerks 1994., osobna komunikacija. Količina hrane trebala bi omogućiti dovoljan rast i razmnožavanje te bi stvaranje amonijaka i rast gljivica u kulturi trebala svesti na minimum. Hrana se može davati dvaput tjedno (primjerice, 0,6 – 0,8 mg po cm^2 površine sedimenta). Praktično iskustvo pokazalo je da upotreba hrane koja je suspendirana i homogenizirana u deioniziranoj vodi može olakšati raspodjelu homogenizirane hrane po površini sedimenta u spremnicima za uzgoj kulture.

Da bi se izbjeglo stvaranje amonijaka, vodu iznad sedimenta potrebno je mijenjati protočnim sustavom ili, barem jednom tjedno, ručno. Sediment je potrebno mijenjati svaka tri mjeseca u matičnim kulturama.

Ako su potrebni samo odrasle jedinke, crvi se iz kulture mogu uzorkovati prosijavanjem kulture sedimenta kroz sito od jednog milimetra. Za zadržavanje kokona prikladna je mrežica od 0,5 mm, a za mlade crve sito od 0,25 mm. Sita se mogu spustiti u obrađenu vodu nakon što sediment prođe. Crvi izlaze iz sita i tada se mogu vaditi iz vode hvataljkom od mekanog željeza ili pipetom s rubovima poliranima vatrom.

▼M6

Za početak ispitivanja ili novih kultura upotrebljavaju se samo netaknute i jasno utvrđene jedinke vrste *Tubifex tubifex* (primjerice (64)). Bolesni i ozlijeđeni crvi kao i kokoni zaraženi hifama gljiva moraju se baciti.

Sinkronizirana kultura može omogućiti crve određene dobi u prikladnim intervalima po želji. Posude za uzgoj nove kulture postavljaju se u odabranim intervalima (primjerice svaka dva tjedna), počevši sa životinjama određene dobi (primjerice kokonima). U ovdje opisanim uvjetima kulture crvi su odrasli nakon osam do deset tjedana. Kulture se mogu skupiti kada crvi polože nove kokone, odnosno nakon deset tjedana. Uzorkovani odrasli primjerci mogu se upotrijebiti za ispitivanja, a nove se kulture mogu pokrenuti s kokonima.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

I vrsta *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) nastanjuje slatkovodne sedimente diljem svijeta te se često upotrebljavaju u ekotoksikološkim ispitivanjima. Informacije o biologiji, uvjetima kulture i osjetljivosti vrste mogu se dobiti iz (1)(6)(9)(36). U skladu s (8) i unutar određenih ograničenja, i kultura vrste *Lumbriculus variegatus* može se uzgajati u umjetnom sedimentu preporučenom za vrstu *T. tubifex*. Budući da vrsta *L. variegatus* u prirodi preferira grublje sedimente od vrste *T. tubifex (59)*, laboratorijske kulture s umjetnim sedimentom koji se upotrebljava za vrstu *T. tubifex* mogu uginuti nakon četiri do šest mjeseci. Praktično iskustvo pokazalo je da se vrsta *L. variegatus* u pjeskovitom supstratu (primjerice kvarcni pijesak, fini šljunak) u protočnim sustavima u kojima se kao izvor prehrane upotrebljava riblja hrana može držati nekoliko godina, a da se ne obnavlja supstrat. Velika prednost vrste *L. variegatus* pred ostalim vrstama vodenih oligoheta jest njezino brzo razmnožavanje čiji je rezultat brzo povećanje biomase u laboratorijski uzgojenim populacijama (1)(6)(9)(10).

Metode uzgoja

Uvjeti kulture za vrstu *Lumbriculus variegatus* detaljno su navedeni u: Phipps *et al.* (1993) (10), Brunson *et al.* (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Kratak sažetak tih uvjeta naveden je u nastavku.

Crvi se mogu uzgajati u velikim akvarijima (57 – 80 l) pri temperaturi od 23 °C s fotoperiodom od 16L: 8D (100 – 1 000 luxa) s pomoću svakodnevno obnovljene prirodne vode (45 – 50 l po akvariju). Supstrat se priprema rezanjem nebijeljenih ručnika od smeđeg papira u trake koje se potom nekoliko sekundi mogu miješati s vodom kulture, što rezultira malim komadima papirnog supstrata. Ovaj se supstrat potom može izravno upotrebljavati u akvarijima kulture *Lumbriculus* tako da se pokrije dno akvarija ili da se smrznut uskladišti u deioniziranoj vodi za kasniju upotrebu. Novi supstrat u spremniku općenito će trajati otprilike dva mjeseca.

Svaka kultura crva pokreće se s 500 – 1 000 crvi koji se hrane sa suspenzijom od 10 ml koja sadržava šest grama prve hrane za pastrve triput tjedno u uvjetima obnavljanja ili protoka. Statičke ili polustatičke kulture trebale bi dobivati manje količine hrane kako bi se spriječio rast bakterija i gljivica. Potrebno je analizirati hranu i papirni supstrat za tvari koji će se upotrebljavati u ispitivanjima bioakumulacije.

Pod tim se uvjetima broj jedinaka u kulturi općenito udvostruči za otprilike deset do 14 dana.

Vrsta *Lumbriculus variegatus* može se ukloniti iz kultura, primjerice prenošenjem supstrata finom mrežicom ili organizama u zasebnu čašu s pomoću vatrom polirane staklene pipete širokog otvora (promjer od približno 5 mm). Ako se supstrat suprenosi u tu čašu, čaša koja sadržava crve i supstrat ostavlja se tijekom noći u

▼M6

uvjetima protoka u kojima će se iz čaše ukloniti supstrat, dok će crvi ostati na dnu posude. Može ih se dodati u novopripremljene spremnike za uzgoj kulture ili se dalje obrađivati za ispitivanje, kako je naznačeno u (1) i (6). Potrebno je spriječiti ozljede ili autotomiju crva, primjerice upotrebom pipeta čiji su rubovi polirani vatrom ili iglicama od nehrđajućeg čelika za rukovanje tim crvima.

Pri upotrebi vrste *L. variegatus* u ispitivanjima bioakumulacije u sedimentu kritički treba razmotriti problem njezina načina razmnožavanja (arhitomija nakon koje slijedi morfalaksa). Ovakvo aseksualno razmnožavanje rezultira dvama fragmentima koji se ne hrane tijekom određenog razdoblja dok se ne regenerira dio s glavom ili repom (primjerice (36)(37)). To znači da apsorpcija konzumiranjem sedimenta i tvari koja onečišćava u vrsti *L. variegatus* možda neće biti kontinuirana kao u tubificidima koji se ne razmnožavaju fragmentacijom.

Stoga bi se trebala provesti sinkronizacija radi minimaliziranja nekontroliranog razmnožavanja i regeneracije te naknadne visoke varijacije u rezultatima ispitivanja. Primjerice, do takve varijacije može doći kada su neke jedinke, koje su se fragmentirale i stoga se ne trebaju hraniti tijekom određenog razdoblja, manje izložene ispitivanoj tvari od ostalih jedinaka koje se tijekom ispitivanja ne fragmentiraju (38). Crve je potrebno umjetno fragmentirati (sinkronizacija) deset do 14 dana prije početka izlaganja (65). Trebali bi se upotrebljavati veliki crvi koji, po mogućnosti, ne pokazuju znakove nedavne fragmentacije. Ti se crvi mogu staviti na stakalce u kapi vode iz kulture te skalpelom izrezati u središnjem području tijela. Potrebno je pripaziti da stražnji dijelovi budu slične veličine. Stražnje je dijelove tada potrebno ostaviti da u posudi za uzgoj kulture koja sadržava isti supstrat koji je upotrijebljen u kulturi i obrađenu vodu regeneriraju nove glave do početka izlaganja. Regeneracija novih glava indicirana je kada sinkronizirani crvi ruju u supstratu (prisutnost regeneriranih glava može se potvrditi pregledom reprezentativnog poduzorka pod binokularnim mikroskopom). Stoga se od ispitnih organizama očekuje da budu u sličnom fiziološkom stanju. To znači da se, kad tijekom ispitivanja u sinkroniziranih crva dolazi do regeneracije morfalaksijom, očekuje da sve životinje budu jednako izložene sedimentu koji je obrađen postupkom spikinga. Sinkronizirane crve potrebno je nahraniti čim počnu rovati u supstratu ili sedam dana nakon seciranja. Režim hranjenja trebao bi biti usporediv s regularnim kulturama, no može se savjetovati hranjenje sinkroniziranih crva istim izvorom hrane koji će se upotrebljavati u ispitivanju. Crve je potrebno držati na ispitnoj temperaturi, pri 20 ± 2 °C. Nakon regeneracije za ispitivanje bi se trebali upotrebljavati netaknuti cijeli crvi slične veličine koji aktivno plivaju ili puze na nježan mehanički poticaj. Potrebno je spriječiti ozljede ili autonomiju crva, primjerice upotrebom pipeta čiji su rubovi polirani vatrom ili iglicama od nehrđajućeg čelika za rukovanje tim crvima.

Zbog specifičnog načina razmnožavanja ove vrste, kada se pri ispitivanju upotrebljava *Lumbriculus variegatus*, tijekom ispitivanja bi, ako su uvjeti prikladni, moglo doći do povećanja u broju crva (6). Potrebno je zabilježiti izostanak razmnožavanja u ispitivanju bioakumulacije s vrstom *L. variegatus* te to razmotriti pri tumačenju rezultata ispitivanja.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (nije potvrđeno u prstenastom testu)**

Vrsta *Branchiura sowerbyi* nastanjuje različite vrste sedimenata ležišta, jezera, jezeraca i rijeka, izvorno u tropskim područjima. Može se pronaći i u tijelima tople vode sjeverne hemisfere. Međutim, više ih je u sedimentima mulja i gline s visokim udjelom organske tvari. Nadalje, crvi žive u sloju sedimenta. Čak je i stražnji dio crva obično ukopan. Ova se vrsta lako identificira po škržnim filamentima na njihovu stražnjem dijelu. Odrasle jedinke mogu dosegnuti duljinu od

▼M6

devet do 11 cm i mokru masu od 40 do 50 mg. Crvi imaju visoku stopu razmnožavanja, pokazuju vrijeme populacijskog udvostručivanja od najmanje dva tjedna u uvjetima temperature i hranjenja navedenima u nastavku (Aston *et al.*, 1982, (65)). Vrsta *B. sowerbyi* upotrijebljena je i u ispitivanjima toksičnosti i bioakumulacije (Marchese & Brinkhurst 1996, (31), odnosno Roghair *et al*. 1996, (67)).

Metode uzgoja

Sažetak uvjeta kulture za vrstu *Branchiura sowerbyi* naveden je u nastavku (prema Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, i Carli J. Roghair, RIVM, Nizozemska).

Za uzgoj kulture ispitivanih organizama nije potrebna nikakva tehnika. Organizmi se mogu uzgajati s pomoću nekontaminiranog prirodnog segmenta (31). Praktično iskustvo pokazalo je da, u usporedbi s čistim prirodnim sedimentom, medij koji se sastoji od prirodnog sedimenta i pijeska poboljšava stanje crva (32) (67). Za uzgoj kulture mogu se upotrebljavati 3 L-čaše koje sadržavaju 1 500 ml medija sediment-voda koji se sastoji od 375 ml prirodnog nekontaminiranog sedimenta (približno 10 % ukupnog organskog ugljika; približno 17 % čestica ≤ 63 μm), 375 ml čistog pijeska (M32) i 750 ml obrađene vode ili vode iz slavine iz koje je uklonjen klor (31)(32)(67). I papirnati ručnici mogu se upotrebljavati kao supstrat za uzgoj kulture, no rast populacije niži je nego u prirodnom sedimentu. U polustatičkim sustavima sloj vode u čaši polako se dozračuje te je vodu nad sedimentom potrebno obnavljati na tjednoj bazi.

Svaka čaša na početku sadržava 25 mladih crva. Nakon dva mjeseca iz sedimenta se pincetom vade veliki crvi i stavljaju u novu čašu s novim medijem sedimenta-vode. I stara čaša sadržava kokone i mlade crve. Na ovaj se način po čaši može skupiti do 400 mladih crva. Odrasli se crvi za razmnožavanje mogu upotrebljavati barem jednu godinu.

Kulture je potrebno održavati na temperaturi od 21 do 25 °C. Varijaciju temperature potrebno je držati ispod ± 2 °C. Vrijeme potrebno za embrionalni razvoj od jajašca koje je sneseno dok mladi ne iziđu iz kokona približno iznosi tri tjedna pri 25 °C. Utvrđeno je da je raspon proizvodnje jajašaca dobivenih po crvu koji je preživio iz vrste *B. sowerbyi* od 6,36 (31) do 11,2 (30) u mulju pri 25 °C. Broj jajašaca po kokonu u rasponu je od 1,8 do 2,8 (66) (69) ili sve do osam (68).

Svakog tjedna potrebno je mjeriti otopljeni kisik, tvrdoću vode, temperaturu i pH-vrijednost. Riblja hrana (primjerice TetraMin®) može se dodavati kao suspenzija dvaput ili triput tjedno *ad libitum*. Crvi se mogu hraniti i odmrznutom salatom *ad libitum*.

Velika prednost ove vrste jest visoka pojedinačna biomasa (do 40 – 50 mg mokre mase po jedinki). Stoga se ova vrsta može upotrebljavati za ispitivanje bioakumulacije ispitnih tvari koje nisu radioaktivno obilježene. Ona se može se izložiti u sustavima koji se upotrebljavaju za *T. tubifex* ili *L. variegatus* sa samo jednom jedinkom po višestrukom određivanju (11). Međutim, replike je tada potrebno povećati, osim ako se upotrebljavaju veće ispitne posude (11). Jednako tako, uvjet valjanosti koji je povezan s rovanjem potrebno je prilagoditi za ovu vrstu.

▼**M6**

LITERATURA

(1) ASTM International (2000.). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688. – 00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Europska komisija (EK) (2003.). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

(3) OECD (1992.a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. i Winger, P.V. (1995.). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885. – 1894.

(5) Poglavlje C.13. ovog Priloga, Biokoncentracija: test s ribama u protočnom postupku.

(6) US EPA (2000.). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Poglavlje C.27. ovog Priloga, Test toksičnosti trzalaca (Chironomidae) u vodi iz sedimenta sa sedimentom obrađenim spikingom.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997.). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835. – 852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003.). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872. – 885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993.). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269. – 279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999.). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26. – 27. 4. 1999., Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006.). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990.). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301. – 310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991.). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. u: R. Nagel and R. Loskill (ur.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992.). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709. – 1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989.). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Res. Res. 23, 1443 – 1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990.). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. Res. 24, 1225. – 1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994.). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457. – 1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994.). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501. – 1514.

(20) OECD (2000.). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) US EPA (1996.). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Sljedeća poglavlja ovog Priloga:

Poglavlje A.4., Tlak pare

Poglavlje A.5., Površinska napetost

Poglavlje A.6., Topljivost u vodi

Poglavlje A.8., Koeficijent razdjeljenja, metoda protresanjem u tikvici

Poglavlje A.24., Koeficijent razdjeljenja (n-oktanol/voda), metoda visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC)

Poglavlje C.7., Razgradnja – abiotička razgradnja: hidroliza kao funkcija pH

Poglavlje C.4 A. – F. Određivanje lake biorazgradivosti

Poglavlje C.19., Procjena koeficijenta adsorpcije (K_{oc}) na tlo i kanalizacijski mulj primjenom tekućinske kromatologije visoke djelotvornosti (HPLC)

Poglavlje C.29., Laka biorazgradivost CO_2 u zabrtvljenim posudama

(23) OECD (1996.). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991.). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165. – 172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000.). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (urednik), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Urednik vol.: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235. – 276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982.). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309. – 320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988.). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. Res. 22, 701. – 707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998.). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191. – 201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991.). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061. – 1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981.). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155. – 160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996.). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163. – 168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994.). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Poglavlje C.1. ovog Priloga, Akutna toksičnost za ribe.

(34) OECD (1992.c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984.). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181. – 184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998. Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183. – 194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998. Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196. – 2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998.). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503. – 1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999.). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111. – 124.

▼**M6**

(40) Poglavlje C.8. ovog Priloga, Toksičnost za gujavice.

(41) Environment Canada (1995.). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989.). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588. – 595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980.). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). u: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (ur.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175. – 184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998.). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391. – 94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993.). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996.). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897. – 1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999.). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244. – 1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991.). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431. – 1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985.). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099. – 1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959.). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911. – 917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999.). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991.). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991.). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411. – 421.

(54) Nagel, R. (1988.). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991.). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305. – 312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996.). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277. – 285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003.). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167. – 1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993.). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163. – 1175.

(59) Wachs, B. (1967.). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310. – 386.

(60) Oliver, B. G. (1987.). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785. – 790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982.a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47. – 67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982.b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69. – 78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999.). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. u: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (ur.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971.). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005.). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982.). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137. – 145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996.). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984.). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89. – 94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994.). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267. – 274.

▼M7

C.47. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA RIBAMA U RANOM ŽIVOTNOM STADIJU

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 210 (2013.). Cilj je ispitivanja na ribama u ranom životnom stadiju određivanje letalnih i subletalnih učinaka kemikalija na ispitivane stadije i vrste. Njima se dobivaju važni podaci za procjenu kroničnih letalnih i subletalnih učinaka kemikalije na druge vrste riba.

2. Smjernica za ispitivanje 210 temelji se na prijedlogu Ujedinjene Kraljevine o kojem se raspravljalo na sastanku stručnjaka OECD-a održanom u Medmenhamu u Ujedinjenoj Kraljevini u studenome 1988. i ažurirana je 2013. kako bi se obuhvatila iskustva u primjeni ispitivanja i preporuke s radionice OECD-a o ispitivanju toksičnosti za ribe održane u rujnu 2010. (1.).

NAČELO ISPITIVANJA

3. Ribe u ranom životnom stadiju izlažu se različitim koncentracijama ispitivane kemikalije otopljene u vodi. Prednost imaju protočni uvjeti, no prihvatljivi su i polustatički uvjeti ako to nije moguće. Dodatne informacije mogu se pronaći u Smjernici OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (2.). Ispitivanje započinje stavljanjem oplođenih jajašaca u ispitne komore i nastavlja se u razdoblju potrebnom da ribe iz kontrolnih skupina dosegnu stadij juvenilnih riba koje je specifično za pojedinu vrstu. Letalni i subletalni učinci procjenjuju se i uspoređuju s kontrolnim vrijednostima radi određivanja najniže koncentracije s vidljivim učinkom (LOEC) kako bi se utvrdilo najvišu koncentraciju bez vidljivog učinka (NOEC) i/ili vrijednost ECx (npr. EC10, EC20) primjenom regresijskog modela za procjenu koncentracije koja bi izazvala x-postotnu promjenu izmjerenog učinka. Izvješćivanje o koncentracijama s relevantnim učinkom i parametrima može ovisiti o zakonodavnom okviru. Ispitne koncentracije trebale bi obuhvaćati ECx tako da se ECx može dobiti interpolacijom, a ne ekstrapolacijom (za definicije vidjeti Dodatak 1.).

PODACI O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

4. Ispitivana kemikalija odnosi se na ono što se ispituje. Treba biti poznata topljivost u vodi (vidjeti poglavlje A.6. ovog Priloga) i tlak pare (vidjeti poglavlje A.4. ovog Priloga) ispitivane kemikalije te treba biti raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju kemikalije u ispitnim otopinama s poznatom i dokumentiranom točnošću i granicom kvantifikacije. Iako nisu nužni za provođenje ispitivanja, rezultati ispitivanja akutne toksičnosti za ribe (vidjeti poglavlja C.1. ili C.49. ovog Priloga), po mogućnosti provedenog s vrstom odabranom za ovo ispitivanje, mogu pružiti korisne podatke.

5. Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje smjese, potrebno je što više informacija o sastavu smjese, npr. o kemijskom identitetu njezinih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i specifičnim svojstvima (poput prethodno navedenih). Prije uporabe ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.

6. Korisno je imati informacije o strukturnoj formuli, čistoći tvari, topljivosti u vodi, stabilnosti u vodi i na svjetlosti, vrijednostima pK_a i P_{ow} te rezultatima ispitivanja lake biorazgradivosti (vidjeti npr. poglavlja C.4. ili C.29. ovog Priloga).

▼M7

VALJANOST ISPITIVANJA

7. Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

— tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi >60 % vrijednosti zasićenja zrakom,

— razlike u temperaturi vode između ispitnih komora odnosno između uzastopnih dana ne bi smjele ni u jednom trenutku tijekom ispitivanja biti veće od ±1,5 °C i trebale bi biti unutar temperaturnih raspona utvrđenih za predmetnu ispitnu vrstu (Dodatak 2.),

— obvezno je analitičko mjerenje ispitnih koncentracija,

— ukupno preživljavanje oplođenih jajašaca i uspješnost poslije valjenja u kontrolama i, prema potrebi, kontrolama s otapalom trebalo bi biti veće ili jednako graničnim vrijednostima definiranima u Dodatku 2.

8. Ako se uoči manje odstupanje od kriterija valjanosti, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost podataka iz ispitivanja i ta razmatranja uključiti u izvješće. Učinke na preživljavanje, valjenje ili rast koji se pojave u kontroli s otapalom u usporedbi s negativnom kontrolom treba navesti i razmotriti u kontekstu pouzdanosti podataka iz ispitivanja.

OPIS METODE

Ispitne komore

9. Može se upotrijebiti bilo kakva posuda od stakla, nehrđajućeg čelika ili nekog drugog kemijski inertnog materijala. Budući da je poznata velika sposobnost silikona da apsorbira lipofilne tvari, uporabu silikonskih cijevi u protočnim studijama i uporabu silikonskih brtvi u dodiru s vodom treba svesti na najmanju moguću mjeru, primjerice uporabom jednodijelnih staklenih akvarija. Posude moraju biti dovoljno velike da se omogući odgovarajući rast u kontrolnoj skupini, održavanje koncentracije otopljenog kisika (npr. za manje riblje vrste dovoljan je akvarij zapremine 7 l) i usklađenost s kriterijima za gustoću punjenja navedenima u stavku 19. Poželjno je da se ispitne posude nasumično smjeste unutar ispitnog prostora. Prednost se daje nasumičnom bloknom rasporedu u kojem je svako tretiranje prisutno u svakom bloku u odnosu na posve nasumičan raspored. Ispitne posude treba zaštititi od neželjenog uznemiravanja. Ispitni sustav trebalo bi po mogućnosti kondicionirati koncentracijama ispitivane kemikalije dovoljno dugo da se prije unošenja ispitnih organizama pokažu stabilne koncentracije za izlaganje.

Odabir vrste

10. Preporučene riblje vrste navedene su u tablici 1. Ne isključuje se upotreba drugih vrsta, ali to može zahtijevati prilagodbu ispitnog postupka kako bi se osigurali prikladni ispitni uvjeti. U tom slučaju treba navesti razloge za odabir vrste i pokusnu metodu.

Držanje uzgojnih riba

11. Podaci o prikladnim uvjetima za držanje uzgojnog jata mogu se naći u Dodatku 3. i u citiranim izvorima literature 3., 4. i 5.

Postupanje s oplođenim jajašcima, embrijima i ličinkama

12. Na početku izlaganja oplođena jajašca, embriji i ličinke mogu se položiti u manje staklene posude ili posude od nehrđajućeg čelika smještene unutar glavne posude i opremljene mrežastim stranicama odnosno krajevima kako bi se omogućio protok ispitne otopine kroz posudu. Neturbulentno strujanje

▼M7

kroz male posude može se postići na način da se posude objese o polugu koja posude njiše gore-dolje, ali tako da ispitni organizmi ostanu čitavo vrijeme uronjeni. Oplođena jajašca salmonida mogu se položiti na stalke ili mreže s otvorima koji su dovoljno veliki da ličinke nakon što se izvale mogu kroz njih propasti.

13. Ako se za držanje jajašaca unutar glavne ispitne posude upotrebljavaju spremnici za jajašca, rešetke ili mreže, njih je potrebno ukloniti nakon što se ličinke izvale, u skladu sa smjernicama iz Dodatka 3., osim mreža, koje je potrebno zadržati kako bi se onemogućio bijeg ličinaka. Ako ličinke treba premjestiti, ne bi ih trebalo izložiti zraku; ličinke iz spremnika za jajašca ne bi trebalo vaditi mrežicom. Vrijeme premještanja različito je ovisno o vrsti i treba ga zabilježiti u izvješću. Ipak, premještanje nije uvijek potrebno.

Voda

14. Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju (vidjeti Dodatak 4.). Ona treba biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane kemikalije) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), amonijaka, ukupnih rezidualnih klorovih pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba obavljati npr. svake dvije godine ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Ako je poznato da kakvoća vode varira, ta mjerenja treba obavljati češće; učestalost mjerenja ovisi o tome koliko kakvoća vode varira. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 4.

Ispitne otopine

15. Kod protočnih je ispitivanja za dopremanje niza koncentracija u ispitne komore potreban sustav koji stalno odmjerava i razrjeđuje matičnu otopinu ispitivane kemikalije (npr. dozirna crpka, proporcionalni razrjeđivač, sustav za zasićivanje). Protok matičnih otopina i vode za razrjeđivanje tijekom ispitivanja potrebno je provjeravati u intervalima i on tijekom cijelog ispitivanja ne smije odstupati više od 10 %. Pokazalo se da je prikladan protok ekvivalentan barem pet puta većoj količini tekućine od one sadržane u ispitnoj komori u 24 sata (3.). Ipak, ako se poštuje gustoća punjenja navedena u stavku 19., moguć je i manji protok (npr. dva do tri puta veći od količine tekućine u ispitnoj komori) da se spriječi brzo ispiranje hrane.

16. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem matične otopine. Matičnu otopinu potrebno je po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (primjerice miješanjem i/ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije matične otopine mogu se upotrebljavati kolone za zasićivanje (kolone za topljivost) ili pasivne metode doziranja (6.). Upotreba otapala nosača ne preporučuje se. Međutim, ako je potrebno otapalo, istovremeno je potrebno primijeniti i kontrolu s otapalom s jednakom koncentracijom otapala kao što je ona upotrijebljena u skupinama tretiranima kemikalijom; drugim riječima, razina otapala trebala bi po mogućnosti biti jednaka u svim koncentracijama kao i u kontroli s otapalom. U nekim sustavima za razrjeđivanje to bi moglo biti tehnički zahtjevno i u

▼M7

tom bi slučaju koncentracija otapala u kontroli s otapalom trebala biti jednaka najvišoj koncentraciji otapala u tretiranoj skupini. Za tvari koje se teško ispituju potrebno je pročitati Smjernicu OECD-a br. 23 za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (2.). Ako se upotrebljava otapalo, odabir otapala bit će određen kemijskim svojstvima tvari. U Smjernici OECD-a br. 23 preporučuje se maksimalna koncentracija od 100 µl/l. Kako bi se izbjegao eventualni učinak otapala na izmjerene krajnje točke (7.), preporučuje se da se koncentracija otapala svede na najmanju moguću mjeru.

17. Kod polustatičkog ispitivanja mogu se koristiti dva različita postupka obnavljanja. Mogu se pripremiti nove ispitne otopine u čistim posudama te u njih oprezno premjestiti jajašca i ličinke koji su preživjeli, a druga mogućnost je zadržavanje ispitnih organizama u ispitnim posudama uz izmjenu dijela (najmanje dvije trećine) ispitne otopine ili kontrolne tekućine.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

Trajanje

18. Ispitivanje bi trebalo početi što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca i, po mogućnosti, njihova uranjaja u ispitne otopine prije ili što je prije moguće nakon početka brazdanja blastodiska. Trajanje ispitivanja ovisi o vrsti na kojoj se ono vrši. Informacije o preporučenom trajanju nalaze se u Dodatku 2.

Punjenje

19. Broj oplođenih jajašaca na početku ispitivanja treba biti dovoljan da se zadovolje statistički zahtjevi. Jajašca treba nasumično podijeliti po tretiranim skupinama, pri čemu se upotrebljava najmanje 80 jajašaca po koncentraciji, ravnomjerno raspoređenih u najmanje četiri ispitne komore s ponovljenim uzorcima. Gustoća punjenja (biomasa po volumenu ispitne otopine) treba biti dovoljno niska da se koncentracija otopljenog kisika može održati barem na razini 60 % vrijednosti zasićenja zrakom bez aeracije tijekom stadija jajašaca i ličinaka. Preporučena gustoća punjenja kod protočnih ispitivanja iznosi najviše 0,5 g/l mokre mase u 24 sata i najviše 5 g/l otopine u bilo kojem trenutku (3.).

Svjetlo i temperatura

20. Fotoperiod i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Hranjenje

21. Hrana i hranjenje kritični su i bitno je za svaki stadij osigurati pravilnu hranu u odgovarajuće vrijeme i u količinama dostatnima za normalan rast. Hranjenje bi trebalo biti približno jednako u svim posudama s ponovljenim uzorcima osim ako se prilagođava kako bi se u obzir uzela smrtnost. Višak hrane i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nakupljanje otpada. Podroban opis režima hranjenja nalazi se u Dodatku 3., a na temelju stečenog iskustva hrana i režimi hranjenja neprestano se unapređuju u cilju optimizacije rasta i poboljšavanja preživljavanja. Živa hrana način je poboljšavanja uvjeta za život riba i stoga bi je trebalo upotrebljavati umjesto suhe ili smrznute hrane ili kao nadopunu takvoj hrani kad god je to primjereno za vrstu i životni stadij.

Ispitne koncentracije

22. U pravilu je potrebno pet koncentracija ispitivane kemikalije s najmanje četiri ponovljena uzorka po koncentraciji koje se međusobno razlikuju za stalni faktor koji ne premašuje 3,2. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija trebalo bi uzeti u obzir, ako su dostupni, podatke iz ispitivanja akutne toksičnosti, po mogućnosti s istom vrstom, i/ili iz ispitivanja za utvrđivanje raspona (1.). Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija trebalo bi razmotriti sve izvore informacija uključujući i izvore kao što je, primjerice, analogno

▼M7

prenošenje podataka iz ispitivanja akutne toksičnosti za embrije riba. Ispitivanje granične koncentracije, ili prošireno ispitivanje granične koncentracije, s manje od pet koncentracija kao glavno ispitivanje može biti prihvatljivo ako treba utvrditi samo empirijske vrijednosti NOEC-a. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Ne treba ispitivati koncentracije ispitivane kemikalije iznad LC_{50} nakon 96 sati ili 10 mg/l, ovisno o tome što je manje.

Kontrole

23. Ispitivanje niza koncentracija ispitivane kemikalije trebalo bi biti popraćeno kontrolom s vodom za razrjeđivanje i, prema potrebi, kontrolom koja sadržava samo otapalo nosač (vidjeti stavak 16.).

Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

24. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije za sve posude s ponovljenim uzorcima (primjerice mjerenjem ispitnih koncentracija). Potrebno je utvrditi potrebne analitičke metode, uključujući odgovarajuću granicu kvantifikacije (LOQ), i dostatna saznanja o stabilnosti tvari u ispitnom sustavu. Tijekom ispitivanja, koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u redovitim vremenskim razmacima kako bi se odredila izloženost. Potrebno je najmanje pet određivanja. U protočnim sustavima trebalo bi barem jedanput tjedno provesti analitička mjerenja ispitivane kemikalije u jednoj posudi s ponovljenim uzorcima za svaku razinu koncentracije sustavno mijenjajući posude s ponovljenim uzorcima. Dodatnim analitičkim određivanjima često će se poboljšati kvaliteta rezultata ispitivanja. Može biti potrebno filtriranje uzoraka kako bi se uklonile lebdeće čestice (npr. primjenom veličine pora 0,45 μm) ili njihovo centrifugiranje kako bi se osiguralo da se određivanja provode na kemikaliji u stvarnoj otopini. Radi smanjivanja adsorpcije ispitivane kemikalije filtri trebaju biti zasićeni prije upotrebe. Ako se izmjerene koncentracije ne zadržavaju u granicama od 80 do 120 % nazivne koncentracije, koncentracije s učinkom trebalo bi odrediti i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije u protočnim ispitivanjima (vidjeti Dodatak 6. koji se odnosi na ispitnu metodu C.20. za izračun aritmetičke sredine (8.)), odnosno u odnosu na geometrijsku sredinu izmjerenih koncentracija u polustatičkim ispitivanjima (vidjeti Poglavlje 5. u Smjernici OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (2.)).

25. Tijekom ispitivanja trebalo bi barem jedanput tjedno mjeriti otopljeni kisik, pH i temperaturu u svim ispitnim posudama te salinitet i tvrdoću vode, ako je potrebno, na početku i na kraju ispitivanja. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

Zapažanja

26. **Stadij embrionalnog razvoja**: embrionalni stadij na početku izlaganja ispitivanoj kemikaliji treba provjeriti što je preciznije moguće. To se može učiniti pomoću reprezentativnog uzorka jajašaca koja su na prikladan način konzervirana i očišćena.

27. **Valjenje i preživljavanje**: valjenje i preživljavanje treba promatrati najmanje jedanput dnevno i relevantne brojke dokumentirati. Ako se u ranoj fazi embrionalnog razvoja primijete gljivice na jajašcima (npr. tijekom prvog ili drugog dana ispitivanja), ta jajašca treba prebrojiti i ukloniti. Mrtve embrije, ličinke i juvenilne ribe treba ukloniti čim ih se uoči jer se mogu brzo raspasti i druge ih ribe mogu raskomadati. Kod uklanjanja mrtvih jedinki nužan je krajnji oprez kako bi se izbjeglo fizičko ozljeđivanje susjednih jajašaca i ličinaka. Znakovi smrti razlikuju se ovisno o vrsti i životnom stadiju jedinke. Na primjer:

▼M7

— za oplođena jajašca: posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom,

— za embrije, ličinke i juvenilne ribe: nepomičnost i/ili odsutnost pokreta disanja i/ili odsutnost otkucaja srca i/ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje.

28. **Neuobičajen izgled**: broj ličinaka ili juvenilnih riba u kojih su vidljive anomalije u obliku tijela treba bilježiti u odgovarajućim vremenskim razmacima ovisno o trajanju ispitivanja i vrsti opisane anomalije. Važno je napomenuti da je pojava abnormalnih ličinaka i juvenilnih riba prirodna i da ih kod nekih vrsta u kontroli odnosno kontrolama može biti i više postotaka. U slučajevima kad se deformacije i s njima povezano neuobičajeno ponašanje smatraju toliko ozbiljnima da uzrokuju značajnu patnju organizma te kad je anomalija došla do točke nakon koje oporavak nije moguć, organizam se može ukloniti iz testiranja. Te životinje treba usmrtiti i u kasnijoj analizi podataka tretirati kao uginule. Za većinu vrsta preporučenih u ovoj ispitnoj metodi zabilježen je normalan embrionalni razvoj (9., 10., 11. i 12.).

29. **Neuobičajeno ponašanje**: anomalije, npr. hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, neuobičajenu mirnoću i neuobičajeno ponašanje pri hranjenju, treba bilježiti u odgovarajućim vremenskim razmacima, ovisno o trajanju ispitivanja (npr. jednom dnevno za toplovodne vrste). Iako ih je teško kvantificirati, ti učinci mogu, ako se uoče, pomoći pri tumačenju podataka o smrtnosti.

30. **Težina**: na kraju ispitivanja sve preživjele ribe važu se najmanje na osnovi posuda s ponovljenim uzorcima (pri čemu se izvješćuje o broju životinja u posudama s ponovljenim uzorcima i o srednjoj težini po životinji); prednost se daje mokroj masi (ribe osušene upijajućim materijalom), no mogu se dostaviti i podaci o suhoj masi (13.).

31. **Dužina**: na kraju ispitivanja mjere se pojedinačne dužine. Preporučuje se mjerenje ukupne dužine, no u slučaju truleži repne peraje ili erozije peraje treba koristiti standardnu dužinu. Trebalo bi primjenjivati istu metodu za sve ribe u određenom ispitivanju. Pojedinačna dužina može se izmjeriti, na primjer, pomičnim mjerilima, digitalnom kamerom ili kalibriranim okularnim mikrometrom. Tipične minimalne dužine definirane su u Dodatku 2.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

32. Preporučuje se da plan ispitivanja i odabir statističkog testa omogućuju odgovarajuću snagu (80 % ili više) za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o NOEC-u. Izvješćivanje o koncentracijama s relevantnim učinkom i parametrima može ovisiti o zakonodavnom okviru. Ako je potrebno izvijestiti o vrijednosti EC_x, plan ispitivanja i odabir regresijskog modela trebali bi omogućiti procjenu vrijednosti EC_x tako da i. interval pouzdanosti od 95 % za vrijednost EC_x ne sadržava nulu i nije preširok, ii. interval pouzdanosti od 95 % za predviđenu srednju vrijednost na EC_x ne sadržava kontrolnu srednju vrijednost te iii. nema značajne neprilagođenosti regresijskog modela u odnosu na podatke. Svaki od tih pristupa zahtijeva utvrđivanje postotka promjene na svakoj krajnjoj točki koji je važan za otkrivanje ili procjenu. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da to omogući. Kada prethodno navedeni

▼M7

uvjeti za određivanje vrijednosti EC_x nisu ispunjeni, treba primijeniti pristup NOEC. Nije vjerojatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje točke kao ni da će se moći osmisliti izvediv pokus koji bi zadovoljio te kriterije za sve krajnje točke i stoga je važno usredotočiti se na krajnje točke koje su bitne za pokus pri odgovarajućem planiranju pokusa. Statistički dijagrami toka i smjernice za svaki pristup navedeni su u dodacima 5. i 6. kao vodič za obradu podataka i prilikom odabira najprimjerenijeg statističkog testa ili modela. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uvjet da su znanstveno opravdani.

33. Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tablica kontingencije te primjena odgovarajućih metoda statističke analize na temelju te analize. Kako bi se izvršila višestruka usporedba između rezultata pojedinačnih i kontrolnih koncentracija, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov ili Williamsov test trenda postupnim snižavanjem za kontinuirane odgovore odnosno Cochran-Armitageov test trenda postupnim snižavanjem za kvantalne odgovore koji su u skladu s monotoničnim odnosom između koncentracije i odgovora i kod kojih nema znakova ekstrabinomne varijance (14.). Kad postoje znakovi ekstrabinomne varijance, preporučuje se Rao-Scottova modifikacija Cochran-Armitageova testa (15., 16.) odnosno Williamsov ili Dunnettov test (nakon transformacije arkus sinusa drugog korijena) ili Jonckheere-Terpstraov test primijenjen na udjele ponovljenih uzoraka. Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odnosom između koncentracije i odgovora, za kontinuirane odgovore mogle bi biti korisne Dunnettova ili Mann-Whitneyjeva metoda, a za kvantalne odgovore Fisherov egzaktni test (14., 17. i 18.). Pri primjeni bilo koje statističke metode ili modela treba paziti da se ispune zahtjevi metode ili modela (npr. varijabilnost od jedne komore do druge procjenjuje se i uzima u obzir u planu ispitivanja te u primijenjenom ispitivanju ili modelu). Treba ocijeniti normalnost podataka, a u Dodatku 5. navedeno je što treba učiniti s rezidualima iz ANOVA-e. U Dodatku 6. nalaze se dodatna razmatranja u pogledu regresijskog pristupa. Treba razmotriti primjenu transformacija radi ispunjavanja uvjeta statističkog testa. Međutim, transformacije kojima se omogućuje prilagodba regresijskog modela zahtijevaju veliku pažnju budući da, primjerice, promjena od 25 % u netransformiranom odgovoru ne odgovara promjeni od 25 % u transformiranom odgovoru. U svim je analizama jedinica analize ispitna komora, a ne pojedina riba, pa bi eksperimentalna jedinica, testovi hipoteze i regresija trebali to odražavati (3., 14., 19. i 20.).

Izvješće o ispitivanju

34. Izvješće o ispitivanju trebalo bi obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija:

tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi),

tvar s više sastojaka, tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali (UVCB tvari) i smjese:

— opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, soj, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje.

▼M7

Uvjeti ispitivanja:

— ispitni postupak (npr. polustatički ili protočni, punjenje),

— fotoperiod(i),

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora i ponovljenih uzoraka, broj jajašaca u svakom ponovljenom uzorku, materijal i veličina ispitne komore (visina, širina, zapremina), količina vode po ispitnoj komori),

— način pripreme matičnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),

— metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),

— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,

— kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija otopljenog kisika,

— detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta ili vrste hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati o kojima se izvješćuje pojedinačno (ili na temelju ponovljenih uzoraka) te kao srednja vrijednost i koeficijent varijacije, prema potrebi, za sljedeće krajnje točke:

— dokaz da kontrole zadovoljavaju opći standard prihvatljivosti stopa preživljavanja za ispitnu vrstu (Dodatak 2.),

— podaci o smrtnosti u svakom stadiju (embriji, ličinke i juvenilne ribe) te ukupnoj smrtnosti,

— broj dana do valjenja, broj ličinaka koje se svaki dan izvale i kraj valjenja,

— broj zdravih riba na kraju ispitivanja,

— podaci o dužini (navesti je li riječ o standardnoj ili ukupnoj dužini) i težini preživjelih životinja,

— pojavnost, opis i broj morfoloških anomalija, ako ih ima,

— pojavnost, opis i broj učinaka na ponašanje, ako ih ima,

— pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički test ili model),

— najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,

▼M7

— najniža koncentracija s vidljivim učinkom (pri p = 0,05) za svaki ocijenjeni odgovor (LOEC),

— EC_x za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednostosti ECx, nagib krivulje koncentracija-odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške.

Sva odstupanja od ove ispitne metode.

Rasprava o rezultatima, uključujući i sve utjecaje odstupanja od ove ispitne metode na rezultate ispitivanja.

Tablica 1.

Preporučene riblje vrste za ispitivanje

SLATKOVODNE	ESTUARIJSKE i MORSKE
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	*Cyprinodon variegatus* ovčjeglava gavčica
Pimephales promelas debeloglava gavčica	Menidia sp. Menidia sp.
Danio rerio zebrica	
Oryzias latipes medaka	

LITERATURA

1. OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Pariz.

2. OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD, Pariz.

3. ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

4. Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

5. Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

6. Adolfsson-Erici, *et al*. (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.

7. Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

8. Poglavlje C.20. ovog Priloga, Test reproduktivne toksičnosti na vrsti *Daphnia magna*.

9. Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

10. Kimmel, H. B. *et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼M7

11. Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

12. Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

13. Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 – 376.

14. OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Pariz.

15. Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

16. Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing over-dispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

17. Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

18. Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

19. Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

20. McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

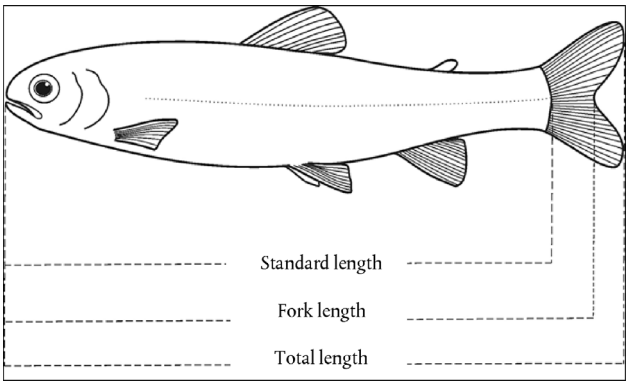
Vilična dužina (FL): odnosi se na dužinu od vrha usta do kraja srednjih šipčica repne peraje i primjenjuje se na ribe kod kojih je teško odrediti gdje završava kralježnica (www.fishbase.org).

Standardna dužina (SL): odnosi se na dužinu ribe izmjerenu od vrha usta do stražnjeg kraja zadnjeg kralješka ili do stražnjeg kraja srednjeg bočnog dijela hipuralne ploče. Jednostavnije rečeno, pri mjerenju se isključuje dužina repne peraje (www.fishbase.org).

Ukupna dužina (TL): odnosi se na dužinu od vrha usta do vrha dužeg režnja repne peraje, obično mjereno na režnjevima stisnutima duž središnje linije. Mjeri se u ravnoj liniji, a ne uz krivulju tijela (www.fishbase.org).

Slika 1.

opis različitih dužina koje se primjenjuju



Kemikalija: tvar ili smjesa.

EC_x: (koncentracija s učinkom od x %) je koncentracija koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan učinak jednak onomu koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uvjeta nisu ispunjena, treba dati detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC). Smjernice se nalaze u dodacima 5. i 6.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

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

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

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*.

▼M7

Dodatak 2.

UVJETI ISPITIVANJA, TRAJANJE I KRITERIJI PREŽIVLJAVANJA ZA PREPORUČENE VRSTE

VRSTE	UVJETI ISPITIVANJA			PREPORUČENO TRAJANJE ISPITIVANJA	Tipična minimalna srednja ukupna dužina riba iz kontrolnih skupina na kraju istraživanja (mm) ([1])	PREŽIVLJAVANJE U KONTROLNIM SKUPINAMA (minimalno)	
	Temperatura (° C)	Salinitet ($^0/_{00}$)	Fotoperiod (u satima)			Uspješnost valjenja	Uspješnost poslije valjenja
Slatkovodne:							
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	10 ± 1,5 ([2])		12 – 16 ([3])	dva tjedna nakon početka samostalnog uzimanja hrane riba iz kontrolnih skupina (ili 60 dana nakon valjenja)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas debeloglava gavčica	25 ± 1,5		16	32 dana nakon početka ispitivanja (ili 28 dana nakon valjenja)	18	70 %	75 %
Danio rerio zebrica	26 ± 1,5		12 – 16 ([4])	30 dana nakon valjenja	11	70 %	75 %
Oryzias latipes medaka	25 ± 2		12 – 16 ([5])	30 dana nakon valjenja	17	80 %	80 %
Estuarijske i morske:							
Cyprinodon variegatus ovčjeglava gavčica	25 ± 1,5	15 – 35 ([5])	12 – 16 ([4])	32 dana nakon početka ispitivanja (ili 28 dana nakon valjenja)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Menidia sp.	22 – 25	15 – 35 ([5])	13	28 dana	20	80 %	60 %

Legenda:

([1]) Tipična minimalna srednja ukupna dužina nije kriterij valjanosti, no trebalo bi pažljivo razmotriti odstupanja ispod navedenih vrijednosti u odnosu na osjetljivost ispitivanja. Minimalna srednja ukupna dužina temelji se na odabranim podacima kojima se trenutačno raspolaže.

([2]) Ovisno o soju kalifornijske pastrve koji se ispituje, možda će trebati primijeniti druge temperature. Uzgojno jato mora se držati na temperaturi jednakoj onoj koja se upotrebljava za jajašca. Nakon primitka jajašaca od komercijalnog uzgajivača potrebna je kratka prilagodba (npr. sat ili dva) na ispitnu temperaturu.

([3]) Ličinke se drže u tami tjedan dana nakon valjenja, osim za vrijeme pregleda, a zatim se tijekom cijelog ispitivanja drže pod prigušenom rasvjetom (fotoperiod 12 – 16 sati). ([4]).

([4]) U svim uvjetima ispitivanja režim svjetlosti mora biti konstantan.

([5]) Za svako ispitivanje mora biti u okvirima ± 2 $^0/_{00}$.

02008R0440 — HR — 16.10.2019 — 008.001 — 2447

▼M7

Dodatak 3.

SMJERNICE ZA HRANJENJE UZGOJNIH I ISPITNIH RIBA PREPORUČENIH VRSTA I ZA POSTUPANJE S NJIMA

VRSTE	HRANA (*)				VRIJEME PREMJEŠTAJA NAKON VALJENJA	VRIJEME DO PRVOG HRANJENJA
	Uzgojne ribe	Novoizvaljene ličinke	Juvenilne ribe			
			Vrsta	Učestalost		
Slatkovodne:						
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	hrana za pastrve	nema ([a])	početna hrana za pastrve BSN	2 – 4 hranjenja dnevno	14 – 16 dana nakon valjenja ili pri isplivavanju (nije nužno)	19 dana nakon valjenja ili pri isplivavanju (nije nužno)
Pimephales promelas debeloglava gavčica	BSN, hrana u listićima FBS	BSN	BSN48, hrana u listićima	2 – 3 puta dnevno	pri valjenju od 90 %	2 dana nakon valjenja
Danio rerio zebrica	BSN, hrana u listićima	komercijalno dostupna hrana za ličinke, praživotinje ([b]), proteini ([c])	BSN48, hrana u listićima	BSN jednom dnevno; hrana u listićima dvaput dnevno	pri valjenju od 90 %	2 dana nakon valjenja
Oryzias latipes medaka	hrana u listićima	BSN, hrana u listićima (ili praživotinje ili kolnjaci)	BSN48, hrana u listićima (ili kolnjaci)	BSN jednom dnevno; hrana u listićima dvaput dnevno ili hrana u listićima i kolnjaci jednom dnevno	nije primjenjivo	6 – 7 dana nakon mriješćenja
Estuarijske i morske:						
Cyprinodon variegatus ovčjeglava gavčica	BSN, hrana u listićima FBS	BSN	BSN48	2 – 3 hranjenja dnevno	nije primjenjivo	1 dan nakon valjenja ili po isplivavanju
Menidia sp. Menidia sp.	BSN48, hrana u listićima	BSN	BSN48	2 – 3 hranjenja dnevno	nije primjenjivo	1 dan nakon valjenja ili po isplivavanju

Legenda:

(*) Hranu treba davati do sitosti. Suvišnu hranu i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nakupljanje otpada.

FBS zamrznuti račići Artemia; odrasli račići Artemia

BSN ličinke račića Artemia; novoizvaljene

BSN48 ličinke račića Artemia; starost 48 sati

([a]) ličinkama sa žumanjčanom vrećicom nije potrebna hrana

([b]) filtrirane iz miješane kulture

([c]) granule iz procesa fermentacije

▼M7

Dodatak 4.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Komponenta	Granična koncentracija
lebdeće čestice	5 mg/l
ukupni organski ugljik	2 mg/l
neionizirani amonijak	1 µg/l
rezidualni klor	10 µg/l
ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
ukupni organoklorni pesticidi plus polikloriranibifenili	50 ng/l
ukupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arsen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
bakar	1 µg/l
željezo	1 µg/l
olovo	1 µg/l
nikal	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živa	100 ng/l
srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatak 5.

STATISTIČKE SMJERNICE ZA ODREĐIVANJE NOEC-A

Općenito

Jedinica analize je akvarij s ponovljenim uzorkom. Stoga za kontinuirana mjerenja, primjerice veličine, treba izračunati srednju vrijednost ili medijan ponovljenog uzorka i te su vrijednosti ponovljenog uzorka podaci za analizu. Treba dokazati snagu testova, po mogućnosti na temelju odgovarajuće baze podataka s prijašnjim podacima za svaki laboratorij. Za svaku krajnju točku treba navesti promjenu veličine koja se može otkriti sa snagom od 75 do 80 % uz statistički test koji će se primijeniti.

Pomoću baza podataka koje su na raspolaganju u trenutku razvoja ove ispitne metode utvrđuje se snaga koja je moguća uz primjenu preporučenih statističkih postupaka. Pojedini laboratoriji trebali bi dokazati svoju sposobnost ispunjavanja tog uvjeta u pogledu snage provođenjem vlastite analize snage ili dokazivanjem da koeficijent varijacije (CV) za svaki odgovor ne prelazi 90. percentil koeficijenata varijacije primijenjenih u razvoju smjernice za ispitivanje. Ti se koeficijenti nalaze u tablici 1. Ako su dostupne samo srednje vrijednosti ili medijani ponovljenog uzorka, koeficijent varijacije unutar ponovljenog uzorka može se zanemariti.

Tablica 1.

90. percentil koeficijenata varijacije (CV) za odabrane slatkovodne vrste

Vrsta	Odgovor	CV među ponovljenim uzorcima	CV unutar ponovljenih uzoraka
kalifornijska pastrva	dužina	17,4	9,8
	težina	10,1	28
debeloglava gavčica	dužina	16,9	13,5
	težina	11,7	38,7
zebrica	dužina	43,7	11,7
	težina	11,9	32,8

Za gotovo sve statističke testove koji se primjenjuju za ocjenu laboratorijskih toksikoloških studija od interesa su usporedbe između tretiranih skupina i kontrole. Stoga nije primjereno zahtijevati značajan F-test analize varijance (ANOVA) prije primjene Dunnettova ili Williamsova testa ili značajan Kruskal-Wallisov test prije primjene Jonckheere-Terpstraova, Mann-Whitneyjeva ili Dunnova testa (Hochberg i Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnettov test ima ugrađenu prilagodbu multipliciteta i na njegov udio lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata negativno utječe primjena F-testa kao mjere nadzora. Na sličan se način Williamsovim i Jonckheere-Terpstraovim testom trenda postupnim snižavanjem primjenom razine značajnosti od 0,05 u svakom koraku održava ukupan udio lažno pozitivnih rezultata od 5 %, a na taj udio i snagu testa negativno utječe primjena F-testa ili Kruskal-Wallisova testa kao mjere nadzora. Mann-Whitneyjev i Dunnov test treba prilagoditi s obzirom na multiplicitet; preporučuje se Bonferroni-Holmova prilagodba.

Detaljna rasprava o većini preporuka u pogledu testiranja hipoteza i provjere valjanosti pretpostavki na kojima se temelje ti testovi nalazi se u Smjernici OECD-a iz 2006., koja sadržava i opsežnu bibliografiju.

▼M7

Postupanje s kontrolama ako se upotrebljava otapalo

Ako se upotrebljava otapalo, treba uključiti kontrolu s vodom za razrjeđivanje i kontrolu s otapalom. Te dvije kontrole treba usporediti u odnosu na svaki odgovor i kombinirati za statističku analizu ako se među njima ne utvrdi znatna razlika. U suprotnom bi trebalo primijeniti kontrolu s otapalom za određivanje NOEC-a ili procjenu vrijednosti EC_x, a kontrola s vodom se ne primjenjuje. Vidjeti ograničenja kriterija valjanosti (stavak 7.).

Za vrijednosti dužine, težine, udjela valjenja iz jajašaca, smrtnosti ličinaka ili abnormalnih ličinaka te za prvi ili zadnji dan valjenja ili isplivavanja treba primijeniti T-test ili Mann-Whitneyjev test radi usporedbe kontrole s vodom za razrjeđivanje i kontrole s otapalom s razinom značajnosti od 0,05, zanemarujući sve tretirane skupine. U izvješću treba navesti rezultate tih testova.

Mjerenja veličine (dužine i težine)

Vrijednosti dužine i težine pojedinih riba mogu biti normalno ili lognormalno distribuirane. U oba su slučaja srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka obično normalno distribuirane zahvaljujući centralnom graničnom teoremu i potvrđene podacima iz preko 100 studija na ribama triju slatkovodnih vrsta u ranom životnom stadiju. Ako podaci ili baze podataka s prijašnjim podacima ukazuju na lognormalnu distribuciju vrijednosti veličine pojedinih riba, druga je mogućnost izračun logaritama srednjih vrijednosti ponovljenih uzoraka za pojedine ribe, a u tom slučaju podaci za analizu mogu biti antilogaritmi tih logaritama srednjih vrijednosti ponovljenih uzoraka.

Dosljednost podataka treba ocijeniti normalnom distribucijom i homogenošću varijance. U tu svrhu treba upotrijebiti reziduale iz ANOVA-e s koncentracijom kao jedinom eksplanatornom varijablom klase. Može se primijeniti vizualno određivanje na temelju dijagrama rasipanja i histograma ili dijagrama „stabljika – list”. Druga je mogućnost primjena formalnog testa kao što je Shapiro-Wilkov ili Anderson-Darlingov test. Dosljednost s homogenošću varijance može se ocijeniti vizualnim pregledom istog dijagrama rasipanja ili, formalno, Leveneovim testom. Normalnost ili homogenost varijance treba ocijeniti samo za parametarske testove kao što su Williamsov ili Dunnettov test.

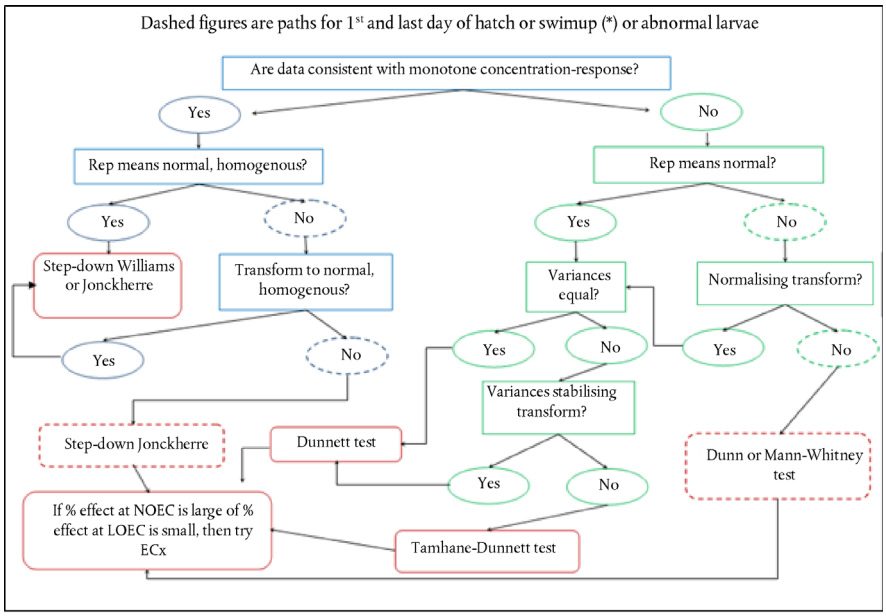
Treba obratiti pažnju na moguće netipične vrijednosti (eng. *outliers*) i njihov utjecaj na analizu. Mogu se primijeniti Tukeyev test netipičnih vrijednosti i vizualni pregled istih gore opisanih dijagrama reziduala. Treba imati na umu da su zapažanja čitavi ponovljeni uzorci, pa se ispuštanje netipičnih vrijednosti iz analize može učiniti tek nakon pomnog razmatranja.

Statistički testovi u kojima se primjenjuju značajke plana ispitivanja i biološka očekivanja su testovi trenda postupnim snižavanjem, primjerice Williamsov i Jonckheere-Terpstraov test. U tim se testovima pretpostavlja monotoničan odnos između koncentracije i odgovora, a dosljednost podataka treba ocijeniti vodeći računa o toj pretpostavci. To se može učiniti vizualno na temelju dijagrama rasipanja srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka u odnosu na ispitnu koncentraciju. Pritom je korisno prekriti taj dijagram rasipanja djelomično linearnim dijagramom i povezati srednje vrijednosti koncentracije ponderirane veličinom ponovljenog uzorka. Veliko odstupanje tog djelomično linearnog dijagrama od monotoničnosti ukazivalo bi na moguću potrebu primjene testova koji nisu testovi trenda. Kao druga mogućnost mogu se primijeniti formalna ispitivanja. Jednostavan formalni test je izračun linearnih i kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti koncentracije. Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan, to ukazuje na mogući problem s monotoničnošću koju bi trebalo dodatno ocijeniti na temelju dijagrama. Ako bi normalnost ili homogenost varijance mogla predstavljati problem, ti se kontrasti mogu konstruirati na temelju transformiranja apsolutnih podataka u raspored. Mogu se primijeniti i alternativni postupci, primjerice Bartholomewov test monotoničnosti, no njima se ispitivanje čini složenijim.

▼M7

Slika 2.:

NOEC – dijagram toka za mjerenja veličine (dužine i težine)



(*) Ti odgovori nikad ne udovoljavaju pretpostavkama za parametarsku analizu ili modele.

Osim ako podaci nisu u skladu sa zahtjevima za te testove, NOEC se određuje primjenom Williamsova ili Jonckheere-Terpstraova testa trenda postupnim sniža-vanjem. Detaljni opis tih postupaka nalazi se u dokumentu OECD-a iz 2006. Za podatke koji nisu u skladu sa zahtjevima za testove trenda postupnim snižava-njem može se primijeniti Dunnettov test ili Tamhane-Dunnettov test (T3); oba testa imaju ugrađene prilagodbe za multiplicitet. U tim se testovima pretpostavlja normalnost i, u slučaju Dunnettova testa, homogenost varijance. Ako ti uvjeti nisu ispunjeni, može se primijeniti Dunnov neparametarski test. Detaljni opis svih tih testova nalazi se u dokumentu OECD-a iz 2006. Na slici 2. nalazi se pregled kako pronaći odabrani test.

Valjenje iz jajašaca i preživljavanje ličinaka

Podaci su udio jajašaca iz kojih se izvale ličinke ili ličinke koje prežive u pojedinim ponovljenim uzorcima. Te bi udjele trebalo ocijeniti u pogledu ekstra-binomne varijance, što je uobičajeno za ta mjerenja, no ne i univerzalno. U dijagramu toka prikazanom na slici 3. daju se smjernice za odabrani test; detaljni opisi nalaze se u tekstu.

Obično se upotrebljavaju dva testa. Riječ je o Taroneovu C(α) testu (Tarone 1979) i testovima hi-kvadratom, koji se odvojeno primjenjuju na svaku ispitnu koncentraciju. Ako se makar u jednoj ispitnoj koncentraciji pronađe ekstrabi-nomna varijanca, treba primijeniti metode kojima se ona uzima u obzir.

Formula 1.

Taroneov C (α) test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

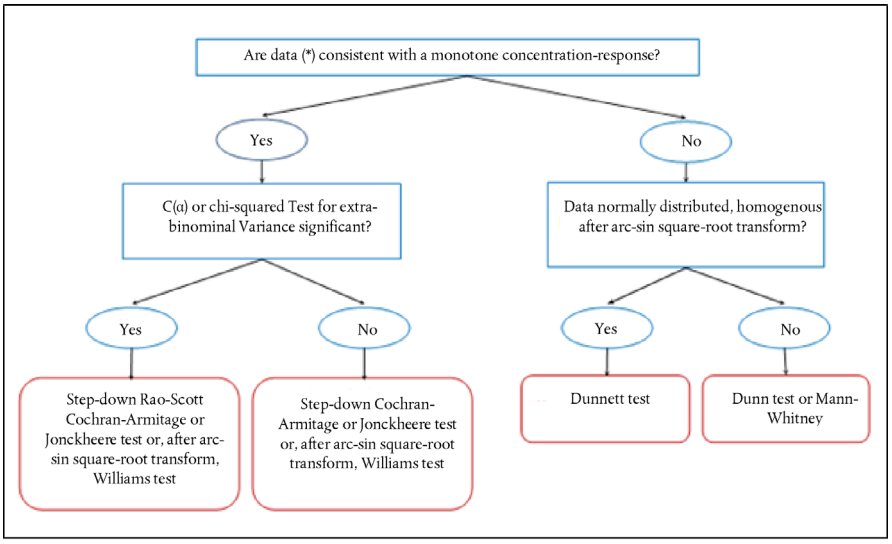
pri čemu je $\hat{p}$ srednji udio za danu koncentraciju, **m** je broj akvarija s ponovljenim uzorcima, $\mathbf{n_j}$ je broj jedinki u ponovljenom uzorku **j** i $\mathbf{x_j}$ je broj jedinki s odgovorom u tom ponovljenom uzorku, npr. neizvaljenih ili mrtvih životinja.

▼M7

Taj se test odvojeno primjenjuje na svaku koncentraciju. On se može promatrati kao prilagođeni test hi-kvadratom, no ograničene simulacije snage koje je proveo Tarone pokazale su da je snažniji od testa hi-kvadratom.

Slika 3.

NOEC – dijagram toka za valjenje iz jajašaca i smrtnost ličinaka



(*) Podaci su udio ponovljenih uzoraka

Ako nema značajnih dokaza u pogledu ekstrabinomne varijance, može se primijeniti Cochran-Armitageov test trenda postupnim snižavanjem. U tom se testu zanemaruju ponovljeni uzorci, pa ako postoje takvi dokazi, Rao-Scottova prilagodba Cochran-Armitageova testa (RSCA) uzima u obzir ponovljene uzorke, veličine ponovljenih uzoraka i ekstrabinomnu varijancu te se preporučuje. Alternativni testovi su Williamsov i Jonckheere-Terpstraov test trenda postupnim snižavanjem te Dunnettov test kako je opisano za mjerenje veličine. Ti se testovi primjenjuju bez obzira na to postoji li ekstrabinomna varijanca ili ne, no njihova je snaga nešto niža (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao i Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Prvi ili zadnji dan valjenja ili isplivavanja

Odgovor je cijeli broj koji se odnosi na broj dana od početka ispitivanja do trenutka kad je primijećeno predmetno zapažanje za određeni akvarij s ponovljenim uzorkom. Raspon vrijednosti općenito je vrlo malen i čest je velik udio povezanih vrijednosti, npr. isti prvi dan valjenja primjećuje se u svim kontrolnim ponovljenim uzorcima i možda u jednoj ili dvije niske ispitne koncentracije. Parametarski testovi kao što su Williamsov ili Dunnettov test nisu primjereni za takve podatke. Osim ako postoje dokazi o ozbiljnoj nemonotoničnosti, Jonckheere-Terpstraov test trenda postupnim snižavanjem vrlo je snažan kad je riječ o otkrivanju učinaka ispitivane kemikalije. U suprotnom se može primijeniti Dunnov test.

Abnormalnosti ličinaka

Odgovor je broj ličinaka u kojih je utvrđen neki oblik abnormalnosti. Taj je odgovor često niske pojavnosti i kod njega se pojavljuju neki problemi kao i za prvi dan valjenja, a ponekad i nepredvidivost u odnosu između koncentracije i odgovora. Ako podaci barem ugrubo slijede monotoničan oblik koncentracije, Jonckheere-Terpstraov test trenda postupnim snižavanjem snažan je test za otkrivanje učinaka. U suprotnom se može primijeniti Dunnov test.

▼**M7**

LITERATURA

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y., D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj (OECD), Pariz.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Dodatak 6.

STATISTIČKE SMJERNICE ZA PROCJENE REGRESIJE

Općenito

Zapažanja koja se upotrebljavaju za prilagodbu modela su srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka (dužina i težina) ili udio ponovljenih uzoraka (valjenje iz jajašaca i smrtnost ličinaka) (OECD 2006).

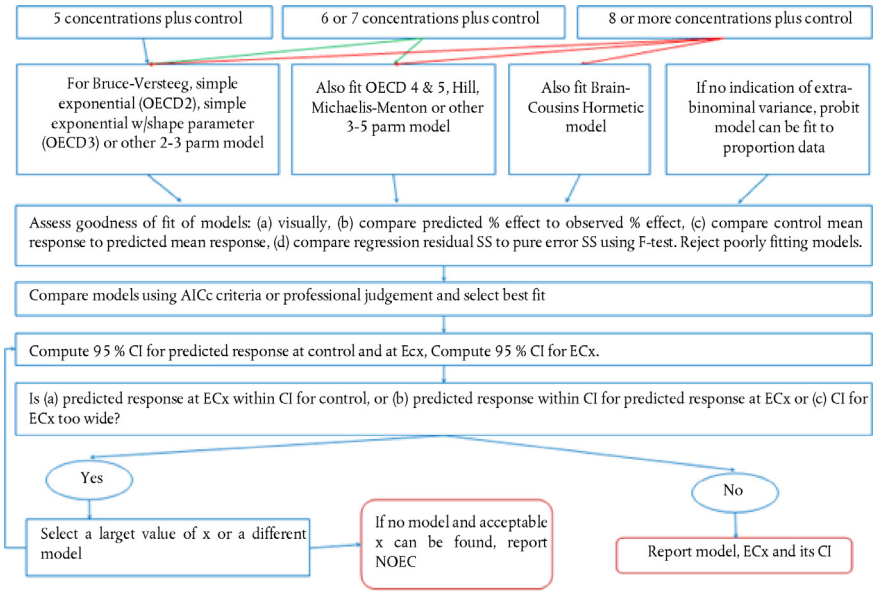
Općenito se savjetuje primjena ponderirane regresije u kojoj je ponder veličina ponovljenog uzorka. Moguće su i druge sheme ponderiranja kao što su ponderiranje predviđenom srednjom vrijednošću odgovora ili kombinacija toga i veličine ponovljenog uzorka. Ne preporučuje se ponderiranje recipročnom vrijednošću varijance uzorka unutar koncentracije (Bunke *et al.* 1999, Seber i Wild 2003, Motulsky i Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

U eventualnim transformacijama odgovora prije analize trebala bi se sačuvati neovisnost zapažanja, a vrijednost ECx i njezine granice pouzdanosti trebalo bi izraziti u izvornim mjernim jedinicama umjesto u transformiranim jedinicama. Primjerice, promjena od 20 % u logaritmu dužine nije istovjetna promjeni od 20 % dužine (Lyles *et al.* 2008, Draper i Smith 1999).

U dijagramu toka prikazanom na slici 4. nalazi se pregled procjena vrijednosti ECx. Pojedinosti su opisane u tekstu u nastavku.

Slika 4.

Dijagram toka za procjenu vrijednosti ECx za srednju vrijednost dužine, težine ili udjela valjenja iz jajašaca ili smrtnosti ličinaka u ponovljenom uzorku; vidjeti tekst za više podataka.



Razmatranja u pogledu valjenja iz jajašaca i smrtnosti ličinaka

Za podatke o valjenju iz jajašaca i smrtnosti ličinaka općenito je najbolje prilagoditi model smanjenja osim ako se prilaagodi probit model kako je opisano u nastavku. Drugim riječima, treba modelirati udio jajašaca iz kojih se ne izvale ličinke ili ličinaka koje uginu. Razlog tome je da se vrijednost ECx odnosi na koncentraciju kod koje postoji promjena jednaka x % srednje vrijednosti odgovora u kontroli. Ako se iz 5 % kontrolnih jajašaca ne izlegnu ličinke i modelira se izostanak valjenja, tada se vrijednost EC20 odnosi na koncentraciju pri kojoj je promjena jednaka 20 % od 5 % izostanaka valjenja u kontroli, a to je promjena od 0,2 × 0,05 = 0,01 ili jedan postotni bod na 6 % izostanaka valjenja. Takva se

▼M7

mala razlika ne može procijeniti ni na kakav smisleni način na temelju raspoloživih podataka i nije biološki značajna. Međutim, ako se modelira udio jajašaca iz kojih se izvale ličinke, kontrolni bi udio u ovom primjeru iznosio 95 %, a smanjenje od 20 % u odnosu na kontrolnu srednju vrijednost bila bi promjena od 0,95 × 0,2 = 0,18, dakle od uspješnosti valjenja od 95 % na 77 % (= 95 – 18) uspješnosti valjenja; ta se koncentracija s učinkom može procijeniti i pretpostavlja se da je od većeg interesa. To ne predstavlja problem u mjerenjima duljine, iako negativni učinci na veličinu općenito znače smanjenje veličine.

Modeli za veličinu (dužinu ili težinu) i uspješnost valjenja odnosno preživljavanje ličinaka

Svi su modeli, osim Brain-Cousensova modela hormeze, opisani i preporučeni u OECD (2006). Slob (2002) razmatra Smjernice OECD-a od 2. do 5. i za pokuse u pogledu ekotoksičnosti. Naravno, postoje i mnogi drugi modeli koji bi mogli biti korisni. Bunke *et al*. (1999) navode brojne modele koji nisu ovdje uključeni i upućivanja na druge modele. Modeli navedeni u nastavku osobito su primjereni i često se upotrebljavaju za pokuse u pogledu ekotoksičnosti.

S pet ispitnih koncentracija plus kontrola

— Bruce-Versteegov model,

— jednostavan eksponencijalni model (OECD 2),

— eksponencijalni model s parametrom oblika (OECD 3),

— jednostavan eksponencijalni model s donjom granicom (OECD 4).

Sa šest ili više ispitnih koncentracija plus kontrola

— eksponencijalni model s parametrom oblika i donjom granicom (OECD 5),

— Michaelis-Menten,

— Hillov model.

Ako postoje vizualni dokazi hormeze (što je malo vjerojatno kad se radi o uspješnosti valjenja ili preživljavanju ličinaka, no ponekad se bilježi u zapažanjima o veličini)

— Brain-Cousensov model hormeze; Brain i Cousens (1989).

Alternativni modeli za neuspješno valjenje i smrtnost ličinaka

— Modeli povećavanja za te odgovore mogu se prilagoditi probit (ili logističkim) modelima ako nema dokaza o ekstrabinomnoj varijanci i ako se pojavnost kontrole procjenjuje u prilagođavanju modela. To nije najbolja metoda jer se u njoj kao jedinica analize uzima jedinka, a ne ponovljeni uzorak (Morgan 1992, O'Hara Hines i Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Kakvoća prilagodbe pojedinog modela

— Vizualno usporedite zapaženo i predviđeno smanjenje u postocima pri svakoj ispitnoj koncentraciji (Motulsky i Christopoulos 2004, Draper i Smith 1999).

— Usporedite kvadratnu srednju vrijednost regresijske pogreške s kvadratnom srednjom vrijednošću čiste pogreške primjenom F-testa (Draper i Smith 1999).

— Provjerite razlikuje li se svaki termin u modelu znatno od nule (tj. odredite jesu li svi termini modela važni) (Motulsky i Christopoulos 2004).

▼M7

— Izradite graf reziduala regresije u odnosu na ispitnu koncentraciju, po mogućnosti na logaritamskoj skali za koncentraciju. Na tom grafu ne bi smio biti vidljiv uzorak; točke bi trebale biti nasumično raspršene oko horizontalne linije na nultoj visini.

— Trebalo bi ocijeniti normalnost podataka i homogenost varijance na isti način kako je opisano u Dodatku 5.

— Dodatno, trebalo bi ocijeniti normalnost reziduala u odnosu na regresijski model primjenom istih metoda navedenih u Dodatku 5. za reziduale iz ANOVA-e.

Usporedba modela

— Primijenite Akaikeove kriterije (AIC). Manje vrijednosti kriterija AIC ukazuju na bolju prilagodbu i ako je AICc(B) – AICc(A) ≥ 10, model A skoro je sigurno bolji od modela B (Motulsky i Christopoulos 2004).

— Vizualno usporedite dva modela s obzirom na to koliko dobro ispunjavaju gore navedene kriterije pojedinog modela.

— Preporučuje se princip štedljivosti, prema kojem se primjenjuje najjednostavniji model koji se u razumnoj mjeri prilagođava podacima (Ratkowsky 1993, Lyles *et al*. 2008).

Kvaliteta procjene vrijednosti EC_x

Interval pouzdanosti (CI) za vrijednost EC_x ne bi smio biti preširok. Pri odlučivanju o tome koliko može biti širok interval pouzdanosti, a vrijednost ECx još uvijek korisna, potrebna je statistička procjena. Simulacije prilagodbe regresijskih modela podacima o valjenju iz jajašaca i o veličini pokazuju da oko 75 % intervala pouzdanosti za vrijednost EC_x (x = 10, 20 ili 30) ne obuhvaća više od dvije ispitne koncentracije. To može poslužiti kao općenita uputa u pogledu prihvatljivosti i kao praktična smjernica o tome što se može postići. Brojni autori naglašavaju potrebu za izvješćivanjem o intervalu pouzdanosti za sve parametre modela i napominju da široki intervali pouzdanosti za parametre modela ukazuju na neprihvatljive modele (Ott i Longnecker 2008, Alvord i Rossio 1993, Motulsky i Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber i Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Interval pouzdanosti (CI) za vrijednost EC_x (ili bilo koji drugi parametar modela) ne bi smio sadržavati nulu (Motulsky i Christopoulos 2004). To je, u regresijskim modelima, ekvivalent minimalnoj značajnoj razlici koja se često citira u pristupima testiranju hipoteze (npr. Wang *et al.* 2000). On odgovara i intervalu pouzdanosti za srednje vrijednosti odgovora pri vrijednosti LOEC koja ne sadržava kontrolnu srednju vrijednost. Pitanje je jesu li procjene parametara znanstveno vjerodostojne. Primjerice, ako interval pouzdanosti za y0 iznosi ± 20 %, nijedna procjena vrijednosti EC_{10} nije vjerodostojna. Ako se modelom predviđa učinak od 20 % pri koncentraciji C, a najveći zapaženi učinak pri koncentraciji C i nižim koncentracijama je 10 %, tada vrijednost EC_{20} nije vjerodostojna (Motulsky i Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Vrijednost EC_x ne bi smjela zahtijevati ekstrapolaciju izvan raspona pozitivnih koncentracija (Draper i Smith 1999, OECD 2006). Na primjer, opća bi uputa mogla biti da vrijednost EC_x ne smije biti niža od oko 25 % ispod najniže ispitane koncentracije ili iznad najviše ispitane koncentracije.

LITERATURA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Pariz.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. KRATKOROČNI REPRODUKCIJSKI TEST NA RIBAMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 229 (2012.). Potreba za razvojem i validacijom testa na ribama s pomoću kojeg je moguće otkriti endokrino aktivne kemikalije pojavila se zbog zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu štetno utjecati na ljude i životinje zbog interakcije tih kemikalija i endokrinog sustava. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta radi revizije postojećih smjernica te razvoja novih smjernica za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora. Jedan element te aktivnosti bio je razvoj smjernice za test probira kemikalija koje djeluju na endokrini sustav riba. Kratkoročni reprodukcijski test na ribama podvrgnut je opsežnom programu validacije koji je uključivao međulaboratorijske studije s odabranim kemikalijama za dokazivanje relevantnosti i pouzdanosti testa u svrhu otkrivanja kemikalija koje utječu na reprodukciju riba različitim mehanizmima, uključujući endokrine modalitete (1., 2., 3., 4. i 5.). Sve su krajnje točke Smjernice OECD-a za ispitivanje validirane ispitivanjima na debeloglavoj gavčici, dok je podskup krajnjih točaka validiran ispitivanjima na medaki (vitelogenin i sekundarna spolna obilježja) i zebrici (vitelogenin). Validaciju su stručno ocijenili vijeće stručnjaka koje su imenovali nacionalni koordinatori programa Smjernice OECD-a za ispitivanje (6.) i neovisno vijeće stručnjaka koje je ovlastila Agencija za zaštitu okoliša SAD-a (29.). Test nije namijenjen za identifikaciju određenih mehanizama hormonalnih poremećaja jer ispitne životinje imaju netaknutu os hipotalamus-hipofiza-gonade (os HPG) koja može reagirati na kemikalije koje na nju utječu na različitim razinama.

2. Ovom se ispitnom metodom opisuje test probira *in vivo,* pri čemu su spolno zreli mužjak i ženka u mrijestu zajedno izloženi kemikaliji tijekom ograničenog dijela životnog ciklusa (21 dan). Po završetku 21-dnevnog razdoblja izlaganja u mužjakâ i ženki mjere se dvije krajnje točke biomarkera kao pokazatelji endokrine aktivnosti ispitivane kemikalije, a te su krajnje točke vitelogenin i sekundarna spolna obilježja. Vitelogenin se mjeri u debeloglave gavčice, medake i zebrice, a sekundarna spolna obilježja mjere se u debeloglave gavčice i medake. Dodatno se tijekom cijelog ispitivanja svakodnevno prati kvantitativna plodnost. Čuvaju se i gonade, a može se ocijeniti histopatologija kako bi se procijenila reproduktivna sposobnost ispitnih životinja i povećala pouzdanost dokaza za druge krajnje točke.

3. Ovaj biotest služi kao reprodukcijski test probira *in vivo*, a njegova primjena trebala bi se promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (30.). U tom se konceptualnom okviru kratkoročni reprodukcijski test na ribama predlaže na trećoj razini kao test *in vivo* kojim se dobivaju podaci o odabranim endokrinim mehanizmima odnosno putovima.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Vitelogenin (VTG) u pravilu nastaje u jetri ženki kralježnjaka koje liježu jaja kao reakcija na cirkuliranje endogenog estrogena. Riječ je o prekursoru proteina u žumanjku koji, nakon nastanka u jetri, putuje krvotokom do jajnika, gdje ga preuzimaju i modificiraju jajašca u razvoju. Vitelogenin je gotovo nemoguće otkriti u plazmi nezrelih ženki i mužjaka riba zbog manjka estrogena u optoku; međutim, jetra je sposobna za sintezu i izlučivanje vitelogenina kao reakciju na egzogenu estrogensku stimulaciju.

▼M7

5. Mjerenje vitelogenina namijenjeno je za otkrivanje kemikalija s različitim estrogenskim načinima djelovanja. Otkrivanje estrogenskih kemikalija moguće je mjerenjem indukcije vitelogenina u mužjaka riba te je opširno dokumentirano u stručno recenziranoj znanstvenoj literaturi (primjerice 7.). Indukcija vitelogenina dokazana je i nakon izlaganja aromatizirajućim androgenima (8. i 9.). Pad razine estrogena u optoku ženki, primjerice inhibicijom aromataze kojom se endogeni androgen pretvara u prirodni estrogen 17β-estradiol, uzrok je pada razine VTG-a koji se upotrebljava za otkrivanje kemikalija sa svojstvima inhibicije aromataze (10. i 11.). Biološka važnost reakcije vitelogenina nakon estrogenske inhibicije / inhibicije aromataze utvrđena je i opširno dokumentirana. Međutim, moguće je da na nastajanje VTG-a u ženki utječu i opća toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, primjerice hepatotoksičnost.

6. Za uobičajenu je upotrebu razvijeno i standardizirano nekoliko metoda mjerenja. Riječ je o metodama enzimskog imunotesta (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) specifičnima za pojedinu vrstu, kod kojih se imunokemija upotrebljava za kvantifikaciju VTG-a nastalog u malim uzorcima krvi ili jetre prikupljenima od pojedinačnih riba (12., 13., 14., 15., 16., 17. i 18.). U svrhu mjerenja VTG-a uzimaju se uzorci krvi debeloglave gavčice i zebrice ili uzorci homogenata s glave/repa te uzorci jetre medake. U medake postoji dobra korelacija između VTG-a izmjerenog u krvi i u jetri (19.). U Dodatku 6. navedeni su preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu VTG-a. Kompleti za mjerenje VTG-a široko su dostupni, a trebali bi se temeljiti na validiranoj metodi ELISA specifičnoj za pojedinu vrstu.

7. Sekundarna spolna obilježja mužjaka određenih ribljih vrsta izvana su vidljiva, može ih se kvantificirati te reagiraju na razine endogenih androgena u optoku; to je tako u slučaju debeloglave gavčice i medake, ali ne i zebrice, koja nema sekundarna spolna obilježja koja se mogu kvantificirati. Ženke zadržavaju sposobnost razvoja muških sekundarnih spolnih obilježja u slučaju izlaganja androgenim kemikalijama u vodi. U stručnoj literaturi dostupno je nekoliko studija u kojima je dokumentirana ta vrsta reakcije u debeloglave gavčice (20.) i medake (21.). Smanjenje sekundarnih spolnih obilježja u mužjaka potrebno je oprezno tumačiti zbog slabe statističke snage te je tumačenje potrebno temeljiti na stručnoj procjeni i pouzdanosti dokaza. Postoje ograničenja u upotrebi zebrica u ovom testu zbog izostanka mjerljivih sekundarnih spolnih obilježja koja reagiraju na kemikalije s androgenim djelovanjem.

8. U debeloglave gavčice glavni je pokazatelj egzogene androgene izloženosti broj izraslina na ustima spolno zrele ženke ribe. U medake je broj papilarnih procesa glavni pokazatelj egzogene izloženosti androgenim kemikalijama ženki riba. U dodacima 5.A i 5.B navedeni su preporučeni postupci za procjenu spolnih obilježja u debeloglave gavčice, odnosno medake.

9. Test na ribama koji traje 21 dan uključuje procjenu kvantitativne proizvodnje jajašaca i očuvanje gonada za neobveznu histopatološku pretragu. Neka regulatorna tijela mogla bi zahtijevati tu dodatnu krajnju točku za sveobuhvatniju procjenu reproduktivne sposobnosti ispitnih životinja ili u slučajevima kada vitelogenin i sekundarna spolna obilježja nisu reagirali na izlaganje kemikaliji. Iako neke krajnje točke mogu biti izuzetno dijagnostičke (npr. indukcija VTG-a u mužjaka i nastanak izraslina u ženki), nisu sve krajnje točke (npr. plodnost i histopatologija gonada) u testu namijenjene za nedvosmisleno utvrđivanje specifičnih staničnih mehanizama djelovanja. Skup krajnjih točaka u cjelini omogućuje izvođenje zaključaka u pogledu mogućih endokrinih poremećaja i time pruža smjernice za daljnja ispitivanja. Iako nije povezana samo s endokrinim sustavom, zbog svoje je dokazane

▼M7

osjetljivosti u odnosu na mnoge poznate endokrino aktivne kemikalije (5.) plodnost važna krajnja točka koju treba uključiti jer kad nema učinka na nju i na druge krajnje točke, veća je vjerojatnost da spoj nije endokrino aktivan. Međutim, kada postoje učinci na plodnost, to će uvelike utjecati na zaključke u pogledu snage dokaza. Upute o tumačenju podataka i prihvatljivosti rezultata ispitivanja za ovu ispitnu metodu navedene su u nastavku.

10. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Tijekom testa mužjaci i ženke reproduktivno sposobnih riba zajednički se izlažu u ispitnim posudama. Zahvaljujući njihovu odraslom i reproduktivnom statusu moguće je jasno razlikovanje spolova, a time i analiza svake krajnje točke koja se odnosi na spol, te je osigurana njihova osjetljivost na egzogene kemikalije. Po završetku ispitivanja spol se potvrđuje makroskopskim pregledom gonada nakon otvaranja trbuha škarama. U Dodatku 2. naveden je pregled relevantnih uvjeta biotesta. Test u pravilu počinje uzimanjem uzorka riba iz populacije u mrijestu, a upotreba starih životinja nije dopuštena. Smjernice o starosti riba i reproduktivnom statusu navedene su u odjeljku o odabiru riba. Test se provodi s pomoću triju koncentracija izloženosti kemikaliji, kontrole s vodom te, prema potrebi, kontrole s otapalom. U slučaju zebrica upotrebljavaju se dvije posude ili dva ponovljena uzorka po tretiranoj skupini (u svakoj se posudi nalazi pet mužjaka i pet ženki). U slučaju debeloglave gavčice upotrebljavaju se četiri posude ili četiri ponovljena uzorka po tretiranoj skupini (u svakoj se posudi nalaze dva mužjaka i četiri ženke). Razlog za to je zadovoljavanje teritorijalnog ponašanja mužjaka debeloglave gavčice uz zadržavanje dostatne snage testa. U slučaju medake upotrebljavaju se četiri posude ili četiri ponovljena uzorka po tretiranoj skupini (u svakoj se posudi nalaze tri mužjaka i tri ženke). Razdoblje izlaganja traje 21 dan, a uzorkovanje riba obavlja se dvadeset prvog dana izlaganja. Svakodnevno se prati kvantitativna plodnost.

12. Pri uzorkovanju 21. dana sve se životinje usmrćuju na humani način. Sekundarna spolna obilježja mjere se u debeloglave gavčice i medake (vidjeti dodatke 5.A i 5.B), uzorci krvi uzimaju se radi određivanja VTG-a u zebrice i debeloglave gavčice, a osim toga, za određivanje VTG-a u zebrice može se uzeti glava odnosno rep (Dodatak 6.), dok se za analizu VTG-a u medake uzima jetra (Dodatak 6.); gonade se fiksiraju u cjelini ili secirane za moguću histopatološku procjenu (22.).

KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ISPITIVANJA

13. Za prihvatljivost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći uvjeti:

— smrtnost u kontrolama s vodom (ili otapalom) ne smije premašiti 10 % na kraju razdoblja izlaganja,

— tijekom razdoblja izlaganja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenja zrakom,

— razlike u temperaturi vode među ispitnim posudama ne bi ni u jednom trenutku tijekom razdoblja izlaganja trebale biti veće od ± 1,5 °C, a temperaturu vode potrebno je održavati unutar raspona od 2 °C unutar temperaturnih raspona za ispitne vrste (Dodatak 2.),

— trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini zadovoljavajuće kretale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,

▼M7

— dokazi da se ribe aktivno mrijeste u svim ponovljenim uzorcima prije početka izlaganja kemikaliji i u kontrolnim ponovljenim uzorcima tijekom ispitivanja.

OPIS METODE

Oprema

14. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

a. mjerači kisika i pH vrijednosti,

b. oprema za određivanje tvrdoće i lužnatosti vode,

c. odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje,

d. akvariji izrađeni od kemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustoću nasada (vidjeti Dodatak 2.),

e. supstrat za mriješćenje debeloglave gavčice i zebrice (potrebni podaci navedeni su u Dodatku 4.),

f. vaga prikladne točnosti (odnosno točnost u rasponu od ± 0,5 mg).

Voda

15. Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. Tijekom razdoblja ispitivanja kakvoća vode treba biti stalna; pH-vrijednost vode trebala bi biti u rasponu od 6,5 do 8,5, ali tijekom predmetnog ispitivanja trebala bi biti u rasponu od ±0,5 pH jedinica. Kako bi se osiguralo da voda za razrjeđivanje ne utječe pretjerano na rezultate ispitivanja (primjerice kompleksacijom s ispitivanom kemikalijom), uzorke za analizu potrebno je uzimati u intervalima. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i SO_4^{2-}), pesticida (npr. ukupni organofosforni i ukupni organoklorni pesticidi), ukupnog organskog ugljika i suspendiranih krutih tvari treba obavljati npr. svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Ako se dokaže da je kakvoća vode stalna tijekom najmanje jedne godine, određivanja se mogu prorijediti i intervali produljiti (primjerice svakih šest mjeseci). Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 3.

Ispitne otopine

16. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem matične otopine. Matičnu otopinu potrebno je po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (primjerice miješanjem ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije matične otopine mogu se upotrebljavati kolone za zasićivanje (kolone za topljivost). Upotreba otapala nosača ne preporučuje se. Međutim, ako je potrebno otapalo, istovremeno je potrebno primijeniti i kontrolu s otapalom u jednakoj koncentraciji kao i onoj upotrijebljenoj u skupinama tretiranima kemikalijom. Za kemikalije koje se teško ispituju otapalo može biti najbolje rješenje s tehničkog stajališta; potrebno je pročitati Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (23.). Odabir otapala bit će određen kemijskim svojstvima tvari ili smjese. U Smjernici OECD-a preporučuje se najveća vrijednost od 100 µl/l, što je potrebno poštovati. Međutim, nedavnom su revizijom (24.) naglašene dodatne dvojbe pri upotrebi otapala za ispitivanje endokrine aktivnosti. Stoga se preporučuje da se koncentracija otapala, ako je otapalo potrebno, svede na najmanju moguću mjeru kad god je to tehnički izvedivo (ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije).

▼M7

17. Za ispitivanje će se upotrijebiti protočni sustav. Tim se sustavom stalno ispušta i razrjeđuje matična otopina ispitivane kemikalije (primjerice pumpa za doziranje, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač) kako bi u ispitne komore pritjecao niz koncentracija. Protoke matičnih otopina i vode za razrjeđivanje tijekom ispitivanja potrebno je provjeravati u intervalima, po mogućnosti jedanput dnevno, i oni za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Potrebno je paziti da se izbjegne upotreba nekvalitetnih plastičnih cijevi ili ostalih materijala koji mogu sadržavati biološki aktivne kemikalije. Pri odabiru materijala za protočni sustav potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane kemikalije na tom materijalu.

Držanje riba

18. Ribe za ispitivanje potrebno je odabrati među laboratorijskom populacijom, a po mogućnosti i iz istog matičnog jata, koje je najmanje dva tjedna prije ispitivanja držano u uvjetima koji su slični uvjetima ispitivanja u smislu kakvoće vode i osvjetljenja. Važno je da gustoća punjenja i gustoća nasada (za definicije vidjeti Dodatak 1.) odgovaraju upotrijebljenoj ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

19. Nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati bilježi se smrtnost uz primjenu sljedećih kriterija:

— smrtnost iznad 10 % populacije u sedam dana: odbacuje se čitava skupina,

— smrtnost između 5 i 10 % populacije: prilagodba još sedam dana; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se čitava skupina,

— smrtnost ispod 5 % populacije u sedam dana: skupina se prihvaća.

20. Ribe se ne smije liječiti tijekom razdoblja prilagodbe, razdoblja prije izlaganja ili tijekom razdoblja izlaganja.

Razdoblje prije izlaganja i odabir riba

21. Preporučuje se jednotjedno do dvotjedno razdoblje prije izlaganja, pri čemu se životinje smještaju u posude slične ispitnim posudama. Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* tijekom razdoblja držanja i faze izlaganja. Faza izlaganja započinje spolno dimorfnom odraslom ribom iz laboratorijske skupine reproduktivno zrelih životinja (primjerice s jasno vidljivim sekundarnim spolnim obilježjima kad je riječ o debeloglavoj gavčici i medaki) koja je u aktivnom mrijestu. Prema općim smjernicama (koje se uzima u obzir uz promatranje stvarnog reproduktivnog statusa predmetne skupine riba) debeloglave gavčice trebale bi biti stare približno 20 (±2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ±2 °C. Medake bi trebale biti stare približno 16 (±2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ±2 °C. Zebrice bi trebale biti stare približno 16 (±2) tjedana pod pretpostavkom da su tijekom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 26 ±2 °C. Proizvodnju jajašaca trebalo bi svakodnevno procjenjivati tijekom razdoblja prije izlaganja. Preporučuje se zapažanje mriješćenja u svim akvarijima s ponovljenim uzorcima prije uključivanja u fazu izlaganja. U ovoj se fazi ne mogu dati kvantitativne smjernice o poželjnoj dnevnoj proizvodnji jajašaca, no prilično se često opaža prosječan mrijest od >10 jajašaca po ženki po danu za svaku vrstu. Za raspoređivanje ponovljenih uzoraka na različite razine izlaganja trebalo bi primijeniti nasumični blokni raspored s obzirom na proizvodnju jajašaca kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela ponovljenih uzoraka.

▼M7

PLAN ISPITIVANJA

22. Upotrebljavaju se tri koncentracije ispitivane kemikalije, jedna kontrola (voda) te, prema potrebi, jedna kontrola s otapalom. Podaci se mogu analizirati radi utvrđivanja statistički značajnih razlika među odgovorima u tretiranim i kontrolnim skupinama. Zahvaljujući tim analizama utvrdit će se je li potrebno daljnje, dugotrajnije ispitivanje štetnih učinaka kemikalije (na preživljavanje, razvoj, rast i reprodukciju), umjesto u svrhu procjene rizika (25.).

23. U zebrica 21. dana pokusa uzimaju se uzorci mužjaka i ženki iz svake skupine tretirane određenom koncentracijom (pet mužjaka i pet ženki u svakom od dvaju ponovljenih uzoraka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina. U medaka 21. dana pokusa uzimaju se uzorci mužjaka i ženki iz svake skupine tretirane određenom koncentracijom (tri mužjaka i tri ženke u svakom od četiri ponovljena uzorka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih spolnih obilježja. U debeloglave gavčice 21. dana izlaganja uzimaju se uzorci mužjaka i ženki (dva mužjaka i četiri ženke u svakom od četiri ponovljena uzorka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih spolnih obilježja. Potrebna je kvantitativna procjena plodnosti, a tkiva gonada potrebno je fiksirati u cjelini ili secirane za eventualnu histopatološku procjenu, prema potrebi.

Odabir ispitnih koncentracija

24. Za potrebe ovog ispitivanja najvišu ispitnu koncentraciju potrebno je odrediti s pomoću maksimalne tolerirane koncentracije (MTK) utvrđene tablicom ili s pomoću ostalih podataka o toksičnosti, ili 10 mg/l, ili maksimalne topljivosti u vodi, što god od toga je najmanje. MTK se definira kao najviša ispitna koncentracija kemikalije čija je posljedica smrtnost manja od 10 %. Ovaj pristup pretpostavlja da postoje empirijski podaci o akutnoj toksičnosti ili drugi podaci o toksičnosti iz kojih se može procijeniti MTK. Procjena MTK-a može biti neprecizna pa je u pravilu potrebna stručna procjena.

25. Potrebne su tri ispitne koncentracije, raspoređene s pomoću stalnog faktora koji ne premašuje 10, te kontrola s vodom za razrjeđivanje (i po potrebi kontrola s otapalom). Preporučuje se raspon faktora raspoređivanja od 3,2 do 10.

POSTUPAK

Odabir i vaganje ispitnih riba

26. Važno je da se razlike u težini riba na početku testa svedu na najmanju moguću mjeru. Odgovarajući rasponi veličina za različite vrste preporučene za ovo ispitivanje navedeni su u Dodatku 2. Za cijelu skupinu riba koja se upotrebljava u ovom ispitivanju pojedinačne težine mužjaka i ženki na početku ispitivanja trebale bi se po mogućnosti kretati u rasponu od ±20 % aritmetičke srednje težine za ribe istog spola. Prije početka ispitivanja preporučuje se vaganje pod-uzorka riblje populacije radi procjene srednje težine.

Uvjeti izlaganja

Trajanje

27. Nakon razdoblja prije izlaganja ispitivanje traje 21 dan. Preporučuje se jednotjedno do dvotjedno razdoblje prije izlaganja.

Hranjenje

28. Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* odgovarajućom hranom (Dodatak 2.) u količinama dovoljnima za zadržavanje tjelesne forme. Treba paziti da ne dođe do povećanja broja mikroba i zamućenja vode. Opća je smjernica da

▼M7

se dnevna količina hrane može podijeliti u dvije ili tri jednake porcije za višekratno hranjenje tijekom dana, pri čemu razmak između hranjenja mora biti najmanje tri sata. Prihvatljiva je i jedna velika porcija, posebno tijekom vikenda. Ribe ne bi trebalo hraniti 12 sati prije uzorkovanja/seciranja.

29. Hranu za ribe potrebno je procijeniti u smislu postojanja kontaminanata poput organoklornih pesticida, policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) i polikloriranih bifenola (PCB). Potrebno je izbjegavati hranu s povišenom razinom fitoestrogena koji bi utjecali na reakciju na test na poznati agonist estrogena (primjerice 17b- estradiol).

30. Nepojedenu hranu i izmet potrebno je uklanjati iz ispitnih posuda najmanje dvaput tjedno, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona.

Svjetlo i temperatura

31. Fotoperiod i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

32. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna saznanja o kemijskoj stabilnosti u ispitnom sustavu. Tijekom ispitivanja, koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u redovnim intervalima kako slijedi: protoke razrjeđivača i toksične matične otopine potrebno je provjeravati po mogućnosti svakodnevno, a najmanje dvaput tjedno; one ne bi trebale varirati više od 10 % tijekom cijelog ispitivanja. Preporučuje se mjerenje stvarnih koncentracija ispitivane kemikalije u svim posudama na početku ispitivanja, a potom svakog tjedna.

33. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom cijelog ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno zadržana unutar ±20 % nazivne koncentracije, tada se rezultati mogu temeljiti na nazivnim ili izmjerenim vrijednostima.

34. U pojedinim je slučajevima uzorke potrebno filtrirati (primjerice s pomoću veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati. U slučaju potrebe preporučuje se centrifugiranje. Ipak, ako se ispitivani materijal ne adsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje.

35. Tijekom ispitivanja potrebno je mjeriti otopljeni kisik, temperaturu i pH-vrijednost u svim ispitnim posudama najmanje jednom tjedno. Ukupnu tvrdoću i lužnatost potrebno je mjeriti najmanje jednom tjedno u kontrolama i jednoj posudi s najvišom koncentracijom. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

Zapažanja

36. Brojne opće (primjerice preživljavanje) i temeljne biološke reakcije (primjerice razine VTG-a) procjenjuju se tijekom testa ili po njegovu završetku. Potrebno je dnevno kvantitativno praćenje plodnosti. Mjerenje i procjena tih krajnjih točaka i njihova korist opisuju se u nastavku.

Preživljavanje

37. Ribe je tijekom razdoblja ispitivanja potrebno svakodnevno pregledavati i evidentirati smrtnost te u najkraćem mogućem roku uklanjati uginule ribe. Uginule ribe ne nadomještaju se novima ni u kontrolnim ni u ispitnim posudama. Spol riba koje su uginule tijekom ispitivanja potrebno je utvrditi makroskopskom procjenom gonada.

▼M7

Ponašanje i izgled

38. Potrebno je evidentirati svako neuobičajeno ponašanje (u odnosu na kontrole), što može uključivati znakove opće toksičnosti, uključujući hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, gubitak ravnoteže te atipično mirovanje ili hranjenje. Potrebno je evidentirati i vanjske abnormalnosti (poput krvarenja, gubitka boje). Pri tumačenju podataka potrebno je pažljivo razmotriti te znakove toksičnosti jer mogu ukazivati na koncentracije pri kojima biomarkeri endokrine aktivnosti nisu pouzdani. Ta zapažanja ponašanja mogu biti i korisne informacije za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Primjerice, teritorijalna agresivnost u normalnih mužjaka ili maskuliniziranih ženki uočena je u debeloglave gavčice u slučajevima izloženosti androgenima, a karakteristično parenje i mriješćenje zebrica u zoru s pojavom svjetla smanjeno je ili narušeno nakon izloženosti estrogenima ili antiandrogenima.

39. S obzirom na to da se neki aspekti izgleda (ponajprije boja) mogu pri rukovanju brzo promijeniti, važno je obaviti zapažanja prije uklanjanja životinja iz ispitnog sustava. Iz dosadašnjeg iskustva s debeloglavim gavčicama poznato je da neke endokrino aktivne kemikalije mogu u početku prouzročiti promjene u sljedećim vanjskim obilježjima: boji tijela (svijetla ili tamna), uzorcima boje (postojanje okomitih pruga) i obliku tijela (glava i prsno područje). Stoga je zapažanja o fizičkom izgledu riba potrebno obavljati tijekom ispitivanja i po završetku studije.

Plodnost

40. Potrebno je svakodnevno bilježiti kvantitativna zapažanja o mriješćenju u ponovljenim uzorcima. Proizvodnju jajašaca treba zabilježiti kao broj jajašaca po preživjeloj ženki po danu u ponovljenom uzorku. Jajašca se svakodnevno uklanjaju iz ispitnih komora. U ispitne komore za debeloglavu gavčicu i zebricu treba staviti supstrate za mriješćenje kako bi se ribama omogućili normalni uvjeti mriješćenja. U Dodatku 4. nalaze se dodatne informacije o preporučenim supstratima za mriješćenje za zebricu (Dodatak 4.A) i debeloglavu gavčicu (4.B). Ne smatra se potrebnim osigurati supstrat za mriješćenje za medaku.

Humano usmrćivanje riba

41. Po završetku izlaganja, odnosno 21. dana, ribe je potrebno usmrtiti odgovarajućom količinom anestetika trikaina (*Tricaine metan sulfonat, Metacain*, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l puferiran s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijev bikarbonat, CAS 144-55-8) kako bi se smanjila iritacija sluznice; nakon toga uzimaju se uzorci krvi ili tkiva radi određivanja VTG-a, kako se opisuje u odjeljku o vitelogeninu.

Zapažanja u pogledu sekundarnih spolnih obilježja

42. Neke endokrino aktivne kemikalije mogu prouzročiti promjene posebnih sekundarnih spolnih obilježja (broj izraslina u spolno zrelih mužjaka debeloglave gavčice, papilarni procesi u mužjaka medake). Naime, kemikalije s određenim načinom djelovanja mogu prouzročiti neuobičajenu pojavu sekundarnih spolnih obilježja u životinja suprotnog spola: primjerice, agonisti receptora za androgene, poput trenbolona, metiltestosterona i dihidrotestosterona, u spolno zrelih ženki debeloglave gavčice mogu prouzročiti pojavu izraženih izraslina odnosno papilarnih procesa u ženki medake (11., 20., 21.). Poznato je i da agonisti receptora estrogena mogu prouzročiti smanjenje broja izraslina i veličine zadebljanja na potiljku odraslih mužjaka debeloglave gavčice (26. i 27.). Ta makromorfološka zapažanja mogu biti korisni

▼M7

kvalitativni i kvantitativni podaci za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Broj i veličina izraslina u spolno zrele debeloglave gavčice i papilarnih procesa u medake mogu se kvantificirati izravno ili praktičnije iz očuvanih uzoraka. Preporučeni postupci za procjenu sekundarnih spolnih obilježja u debeloglave gavčice i medake nalaze se u Dodatku 5.A odnosno Dodatku 5.B.

Vitelogenin (VTG)

43. Krv se uzima iz repne arterije/vene s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice ili punkcijom srca s pomoću šprice. Ovisno o veličini ribe, količina krvi koja se uzima u pravilu se kreće od pet do 60 µl po jednoj debeloglavoj gavčici, odnosno od pet do 15 µl po jednoj zebrici. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem te pohranjuje s inhibitorima proteaze na – 80 °C do analize VTG-a. Druga je mogućnost upotreba jetre medake, odnosno homogenata s glave/repa zebrice kao izvora tkiva za određivanje VTG-a (Dodatak 6.). Mjerenje VTG-a trebalo bi se temeljiti na validiranoj odgovarajućoj metodi ELISA s pomoću odgovarajućeg standarda VTG-a i odgovarajućih antitijela. Preporučuje se primjena metode s pomoću koje se mogu otkriti niske razine VTG-a od nekoliko ng/ml plazme (ili ng/mg tkiva), što je osnovna razina u neizloženih mužjaka riba.

44. Kontrola kvalitete analize VTG-a obavljat će se s pomoću standarda, slijepih proba i najmanje dviju identičnih analiza. Za svaku metodu ELISA potrebno je provesti ispitivanje za učinak matrice (učinak razrjeđivanja uzorka) radi utvrđivanja minimalnog faktora razrjeđivanja uzorka. Na svakoj pločici ELISA za testove VTG-a trebali bi se nalaziti sljedeći uzorci za kontrolu kvalitete: najmanje šest kalibracijskih standarda kojima je obuhvaćen raspon očekivanih koncentracija VTG-a i najmanje jedna nespecifična, obvezujuća slijepa proba (analiziraju se dva ponavljanja). Apsorbancija u tim slijepim probama trebala bi biti manja od 5 % maksimalne apsorbancije pri standardnoj kalibraciji. Analizirat će se najmanje dva alikvota (dvostruka bunarića) svakog razrjeđivanja uzorka. Dvostruke bunariće koji se razlikuju više od 20 % potrebno je ponovno analizirati.

45. Koeficijent korelacije (R^2) za kalibracijske krivulje trebao bi biti veći od 0,99. Međutim, visoka korelacija nije dostatna za jamstvo odgovarajućeg predviđanja koncentracije u svim rasponima. Osim što ima dovoljno visoku korelaciju za kalibracijsku krivulju, koncentracija svakog standarda prema izračunu iz kalibracijske krivulje trebala bi se kretati od 70 do 120 % nazivne koncentracije. U slučaju udaljavanja nazivnih koncentracija od linije regresije kalibracije (primjerice pri nižim koncentracijama) može se pojaviti potreba za razdvajanjem kalibracijske krivulje u niske i visoke raspone ili potreba za primjenom nelinearnog modela za odgovarajuće prilagođavanje podataka o apsorbanciji. U slučaju razdvajanja krivulje, oba segmenta linije trebala bi imati $R^2 > 0,99$.

46. Granica otkrivanja (eng. *limit of detection*, LOD) definira se kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda, dok se granica kvantitacije (eng. *limit of quantitation*, LOQ) definira kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda pomnožena s najnižim faktorom razrjeđivanja.

47. Svakog dana provođenja testova VTG-a analizirat će se uzorak za utvrđivanje izrađen s pomoću referentnog standarda dobivenog ponavljanjem testa (*inter-assay*) (Dodatak 7.). Omjer očekivane i izmjerene koncentracije bilježit će se uz rezultate svakog od niza testova provedenih tog dana.

Procjena histopatološke pretrage gonada

48. Regulatorna tijela mogu zahtijevati histopatološku pretragu gonada radi proučavanja ciljnog organa na osi HPG nakon izlaganja kemikaliji. U tu se svrhu gonade fiksiraju u cjelini ili secirane. Ako je potrebna histopatološka pretraga, pri procjeni endokrinog djelovanja ispitivane kemikalije na gonadama se promatraju specifične reakcije povezane s endokrinim sustavom. Te dijagnostičke reakcije uglavnom uključuju prisutnost oocita u testisima, hiperplaziju Leydigovih stanica, smanjeno stvaranje žumanjka, povećane spermatogonije i perifolikularnu hiperplaziju. Druge lezije gonada kao

▼M7

što su atrezija oocita, degenerativne promjene testisa i promjene stadija mogu imati različite uzroke. U smjernicama o histopatološkim pretragama gonada riba navode se postupci koji se primjenjuju za seciranje, fiksiranje, rezanje i histopatološku procjenu spolnih žlijezda (22.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena reakcija biomarkera s pomoću analize varijance (ANOVA)

49. Reakcije tretiranih i kontrolnih skupina uspoređuju se s pomoću analize varijance (ANOVA) radi identifikacije mogućeg djelovanja kemikalije. U slučaju upotrebe kontrole s otapalom potrebno je za svaku krajnju točku provesti odgovarajući statistički test između kontrola s vodom za razrjeđivanje i kontrola s otapalom. Smjernice o načinu obrade podataka za kontrole s vodom za razrjeđivanje i otapalom u naknadnoj statističkoj analizi nalaze se u dokumentu OECD, 2006c (28.). Sve podatke o biološkim reakcijama potrebno je analizirati i o njima izvijestiti zasebno prema spolu. Ako nisu zadovoljene tražene pretpostavke za parametarske metode – nenormalna distribucija (npr. Shapiro-Wilkov test) ili heterogena varijanca (Bartlettov ili Leveneov test), potrebno je razmotriti mogućnost da se prije provedbe ANOVA-e podaci preoblikuju radi homogenizacije varijanci ili da se provede ponderirana ANOVA. Za nemonotoničnu reakciju na dozu mogu se upotrijebiti Dunnettov test (parametarski) na višestrukim usporedbama parova ili Mann-Whitneyjev test s Bonferronijevom prilagodbom (neparametarski). Ako je reakcija na dozu približno monotonična, mogu se upotrijebiti ostali statistički testovi (primjerice, Jonckheere-Terpstraov ili Williamsov test). Statistički dijagram nalazi se u Dodatku 8. i pomoć je pri odabiru najprikladnijeg statističkog testa. Dodatne informacije nalaze se i u OECD-ovu Dokumentu o postojećim pristupima statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti (28.).

Izvješćivanje o rezultatima ispitivanja

50. Podaci o ispitivanju trebali bi uključivati:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje:

— odgovorne osobe i njihove odgovornosti tijekom ispitivanja,

— svaki laboratorij treba biti dokazano stručan u upotrebi niza reprezentativnih kemikalija.

Ispitivana kemikalija:

— karakterizaciju ispitivane kemikalije,

— fizikalno stanje i relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— metodu i učestalost pripreme ispitnih koncentracija,

— informacije o stabilnosti i biorazgradivosti.

Otapalo:

— karakterizaciju otapala (svojstva, upotrijebljena koncentracija),

— obrazloženje odabira otapala (ako nije riječ o vodi).

▼**M7**

Ispitne životinje:

— vrstu i soj,

— dobavljača i njegov objekt,

— starost riba na početku ispitivanja i reproduktivni status / status mrijesta,

— podatke o postupku aklimatizacije životinja,

— tjelesnu masu riba na početku izlaganja (iz poduzorka upotrijebljenog ribljeg jata).

Uvjeti ispitivanja:

— primijenjeni postupak ispitivanja (vrsta ispitivanja, gustoća punjenja, gustoća nasada itd.),

— metodu pripreme matičnih otopina i protok,

— nazivne ispitne koncentracije, tjedne izmjerene vrijednosti koncentracija ispitnih otopina i primijenjene analitičke metode, srednje izmjerene vrijednosti i standardne devijacije u ispitnim posudama te dokaze da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,

— karakteristike vode za razrjeđivanje (uključujući pH-vrijednost, tvrdoću, lužnatost, temperaturu, koncentraciju otopljenog kisika, razine rezidualnog klora, ukupni organski ugljik, suspendirane krute tvari i sve ostale izmjerene vrijednosti),

— kakvoću vode u ispitnim posudama: pH-vrijednost, tvrdoću, temperaturu i koncentraciju otopljenog kisika,

— precizne informacije o hranjenju (primjerice vrsti/vrstama hrane, porijeklu, količini i učestalosti hranjenja te analizu relevantnih kontaminanata ako postoji (primjerice poliklorirani bifenili, policiklički aromatski ugljikovodici i organoklorni pesticidi).

Rezultati

— dokaze da su kontrole u skladu s kriterijima prihvatljivosti ispitivanja,

— podatke o smrtnosti u svim ispitnim koncentracijama i kontrolama,

— primijenjene statističke analitičke metode, obradu podataka i obrazloženje primijenjenih metoda,

— podatke o biološkim zapažanjima makromorfologije, uključujući sekundarna spolna obilježja, proizvodnju jajašaca i VTG,

— rezultate analiza podataka, po mogućnosti u tabličnom i grafičkom obliku,

— pojavu neobičnih reakcija riba i sve vidljive učinke ispitivane kemikalije.

▼M7

SMJERNICE ZA TUMAČENJE I PRIHVAĆANJE REZULTATA ISPITIVANJA

51. U ovom se odlomku navode određena razmatranja koja treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata ispitivanja različitih izmjerenih krajnjih točaka. Rezultate je potrebno oprezno tumačiti kada se čini da ispitivana kemikalija očito toksično djeluje ili utječe na opće stanje ispitne životinje.

52. Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija potrebno je paziti da se ne premaši maksimalna tolerirana koncentracija kako bi se moglo valjano tumačiti podatke, Važno je da postoji najmanje jedna tretirana skupina u kojoj se ne pojavljuju znakovi toksičnih učinaka. Znakove bolesti i toksičnih učinaka potrebno je detaljno ocijeniti i o njima izvijestiti. Primjerice, moguće je da na nastajanje VTG-a u ženki utječu i opća toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, primjerice hepatotoksičnost. Međutim, u tumačenju učinaka postiže se veća sigurnost ako postoje druge skupine, tretirane različitim koncentracijama, koje nisu narušene sustavnom toksičnošću.

53. Za prihvaćanje rezultata ispitivanja potrebno je razmotriti nekoliko aspekata. Primjerice, razine VTG-a u kontrolnim skupinama mužjaka i ženki trebale bi biti jasne i razlikovati se za približno tri reda veličine u debeloglave gavčice i zebrice, odnosno za jedan red veličine u medake. Primjeri raspona vrijednosti u kontrolnim i tretiranim skupinama nalaze se u izvješćima o validaciji (1., 2., 3. i 4.). Visoke vrijednosti VTG-a u mužjaka iz kontrolnih skupina mogu utjecati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja slabih agonista estrogena. Niske vrijednosti VTG-a u ženki iz kontrolnih skupina mogu utjecati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja inhibitora aromataze i antagonista estrogena. Validacijske studije upotrebljavale su se za izradu te smjernice.

54. Što se tiče kvantifikacije proizvodnje jajašaca, ona je podložna bitnim varijacijama [koeficijent varijacije (CV) može iznositi od 20 do 60 %] koje mogu utjecati na sposobnost testa da otkrije značajno opadanje proizvodnje jajašaca manje od 70 % dok se CV približava vrijednosti od 50 % ili više. Ako se CV zadržava na nižim vrijednostima (oko 20 – 30 %), test će biti prihvatljive snage (80 %) za otkrivanje smanjenja proizvodnje jajašaca od 40 – 50 %. Plan ispitivanja koje se primjenjuje na debeloglavu gavčicu, uključujući četiri ponovljena uzorka za svaku skupinu tretiranu određenom koncentracijom, trebao bi omogućiti veću snagu krajnje točke plodnosti u usporedbi s planom ispitivanja sa samo dva ponovljena uzorka.

55. Ako laboratorij nije ranije proveo test ili ako je došlo do znatnih promjena (primjerice promjene ribljeg soja ili dobavljača), savjetuje se provedba studije tehničke osposobljenosti. Preporučuje se upotreba kemikalija koje uključuju niz načina djelovanja ili učinaka na više krajnjih točaka ispitivanja. U praksi se svaki laboratorij potiče na izradu vlastitih prijašnjih kontrolnih podataka za mužjake i ženke te na primjenu pozitivne kontrolne kemikalije za estrogensko djelovanje (primjerice 17β-estradiola pri 100 ng/l ili poznatog slabog agonista), čija je posljedica povećanje VTG-a u mužjaka riba, pozitivne kontrolne kemikalije za inhibiciju aromataze (primjerice fadrozol ili prokloraz pri 300 μg/l), čija je posljedica smanjenje VTG-a u ženki riba, te pozitivne kontrolne kemikalije za androgensko djelovanje (primjerice 17β-trenbolon pri 5 μg/l), čija je posljedica indukcija sekundarnih spolnih obilježja u ženki debeloglave gavčice i medake. Svi ti podaci mogu se usporediti s dostupnim podacima iz validacijskih studija (1., 2. i 3.) kako bi se osigurala osposobljenost laboratorija.

56. Općenito, vrijednosti VTG-a smatraju se pozitivnima ako je došlo do statistički značajnog povećanja VTG-a u mužjaka ($p < 0,05$) ili statistički značajnog smanjenja u ženki ($p < 0,05$) najmanje pri najvećoj ispitivanoj dozi u usporedbi s kontrolnom skupinom te u izostanku znakova opće

▼M7

toksičnosti. Pozitivan rezultat dodatno je potkrijepljen demonstracijom biološki vjerojatnog odnosa između doze i krivulje reakcije. Kako je prethodno navedeno, smanjenje VTG-a ne mora u potpunosti biti endokrinog podrijetla, ali pozitivan rezultat u pravilu bi trebalo tumačiti kao dokaz endokrinog djelovanja *in vivo* te je potrebno pokrenuti aktivnosti u svrhu dodatnih pojašnjenja.

57. Regulatorna tijela mogu zahtijevati histopatološku pretragu gonada radi utvrđivanja reproduktivne sposobnosti ispitnih životinja i omogućivanja procjene snage dokaza ispitnih rezultata. Histopatološka pretraga gonada možda neće biti potrebna u slučajevima kad su VTG ili sekundarna spolna obilježja pozitivni (tj. povećanje ili smanjenje VTG-a ili indukcija sekundarnih spolnih obilježja).

LITERATURA

1. OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Pariz.

2. OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Pariz.

3. OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Pariz.

4. Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

5. US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15. prosinca 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

6. OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, Pariz.

7. Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

8. Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

9. Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

10. Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

11. Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

12. Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

13. Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelles, Belgija.

14. Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

15. Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

16. Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

17. Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

18. Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

19. Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

20. Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

21. Seki M, *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

22. OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Pariz.

23. OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Pariz

24. Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

25. Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

26. Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

27. Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

28. OECD (2006.c) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Pariz.

29. US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

30. OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Pariz.

▼**M7**

Dodatak 1.

KRATICE I DEFINICIJE

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV: koeficijent varijacije

ELISA: imunoenzimski test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

Gustoća punjenja: mokra masa ribe po volumenu vode.

MTK: maksimalna tolerirana koncentracija, iznosi oko 10 % vrijednosti LC_{50}.

Gustoća nasada: broj riba po volumenu vode.

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

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

▼M7

Dodatak 2.

EKSPERIMENTALNI UVJETI ZA TEST PROBIRA ENDOKRINOG SUSTAVA RIBA

1. Preporučene vrste	Debeloglava gavčica (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrica (*Danio rerio*)
2. Vrsta ispitivanja	Protočno	Protočno	Protočno
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (širokog spektra)	Fluorescentne žarulje (širokog spektra)	Fluorescentne žarulje (širokog spektra)
5. Jakost svjetla	10 – 20 $\mu E/m^2/s$, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 $\mu E/m^2/s$, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)	10 – 20 $\mu E/m^2/s$, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima)
6. Fotoperiod (postupno pojačavanje svjetla u zoru odnosno smanjivanje u sumrak moguće je, no ne smatra se nužnim)	16 sati svjetla, 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame
7. Gustoća punjenja:	< 5 g po l	< 5 g po l	< 5 g po l
8. Veličina ispitne komore	Najmanje 10 l	Najmanje 2 l	Najmanje 5 l
9. Volumen ispitne otopine	Najmanje 8 l	Najmanje 1,5 l	Najmanje 4 l
10. Izmjene volumena ispitnih otopina	Najmanje šest puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno
11. Starost ispitnih organizama	Vidjeti stavak 21.	Vidjeti stavak 21.	Vidjeti stavak 21.
12. Približna mokra masa odraslih riba (g)	Ženke: 1,5 ± 20 % Mužjaci: 2,5 ± 20 %	Ženke: 0,35 ± 20 % Mužjaci: 0,35 ± 20 %	Ženke: 0,65 ± 20 % Mužjaci: 0,4 ± 20 %
13. Broj riba po ispitnoj posudi	Šest (dva mužjaka i četiri ženke)	Šest (tri mužjaka i tri ženke)	Deset (pet mužjaka i pet ženki)
14. Broj tretiranja	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)
15. Broj posuda po tretiranju	Najmanje četiri	Najmanje **četiri**	Najmanje dvije
16. Broj riba po ispitnoj koncentraciji	16 odraslih ženki i osam mužjaka (četiri ženke i dva mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)	12 odraslih ženki i 12 mužjaka (tri ženke i tri mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)	Deset odraslih ženki i deset mužjaka (pet ženki i pet mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)
17. Hranjenje	Živi ili zamrznuti račići Artemia ili njihove ličinke dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Ličinke račića Artemia dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Ličinke račića Artemia dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga

▼M7

18. Dozračivanje (aeracija)	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja zrakom	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja zrakom	Nikakvo, osim ako koncentracija otopljenog kisika padne ispod 60 % zasićenja zrakom
19. Voda za razrjeđivanje	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor
20. Razdoblje prije izlaganja	Preporučuje se 7 – 14 dana	Preporučuje se 7 – 14 dana	Preporučuje se 7 – 14 dana
21. Trajanje izlaganja kemikaliji	21 dan	21 dan	21 dan
22. Biološke krajnje točke	— preživljavanje, — ponašanje, — plodnost, — 2y spolna obilježja, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obvezno)	— preživljavanje, — ponašanje, — plodnost, — 2y spolna obilježja, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obvezno)	— preživljavanje, — ponašanje, — plodnost, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obvezno)
23. Prihvatljivost ispitivanja	Otopljeni kisik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za skupinu tretiranu određenom koncentracijom.	Otopljeni kisik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za skupinu tretiranu određenom koncentracijom.	Otopljeni kisik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 26 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim skupinama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za skupinu tretiranu određenom koncentracijom.

▼M7

Dodatak 3.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

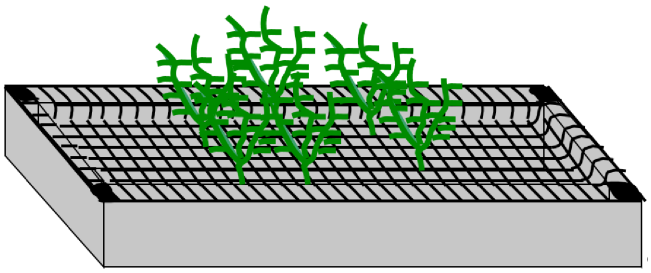
KOMPONENTA	KONCENTRACIJE
lebdeće čestice	< 20mg/l
ukupni organski ugljik	< 2 mg/l
neionizirani amonijak	< 1 µg/l
rezidualni klor	< 10 µg/l
ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
ukupni organoklorni pesticidi plus polikloririrani bifenili	< 50 ng/l
ukupni organski klor	< 25 ng/l

▼M7

Dodatak 4.A

SUPSTRAT ZA MRIJEŠĆENJE ZEBRICE

Ladica za mrijest: staklena, dimenzija primjerice 22 × 15 × 5,5 cm (d × š × v), prekrivena pomičnom žičanom rešetkom od nehrđajućeg čelika (širina otvora 2 mm). Rešetka bi trebala prekrivati otvor posude ispod ruba.



Supstrat za mriješćenje treba pričvrstiti na rešetku. To bi trebao biti prostor u koji ribe mogu ulaziti. Primjerice, prikladno je umjetno akvarijsko bilje izrađeno od zelene plastike (napomena: potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane kemikalije na plastiku). Plastiku je potrebno dovoljno dugo ispirati dovoljnom količinom tople vode kako bi se osiguralo da ne dođe do otpuštanja kemikalija u ispitnu vodu. Pri upotrebi stakla potrebno je osigurati da ne dođe do ozljeđivanja ili prikliještenja riba tijekom njihova energičnoga kretanja.

Udaljenost između ladice i stakla trebala bi biti najmanje 3 cm kako bi se osiguralo da do mriješćenja ne dođe izvan ladice. Jajašca izmriještena u ladicu padaju kroz rešetku i uzorci se mogu uzeti od 45 do 60 minuta nakon početka osvjetljavanja. Prozirna se jajašca ne lijepe i mogu se jednostavno prebrojiti s pomoću transverzalnog svjetla. Pri upotrebi pet ženki po posudi, do 20 jajašaca dnevno može se smatrati malim brojem, do 100 srednjim, a više od 100 velikim. Ladicu za mrijest potrebno je maknuti, jajašca ukloniti i vratiti ladicu u ispitnu posudu što kasnije navečer ili vrlo rano ujutro. Razdoblje do vraćanja ladice ne smije trajati dulje od jednog sata jer u suprotnom supstrat za mriješćenje može potaknuti pojedinačno parenje i mriješćenje u neuobičajeno doba. U slučaju potrebe za kasnijim vraćanjem ladice za mrijest to treba učiniti najmanje devet sati nakon početka osvjetljavanja. U to kasno doba dana više nema mriješćenja.

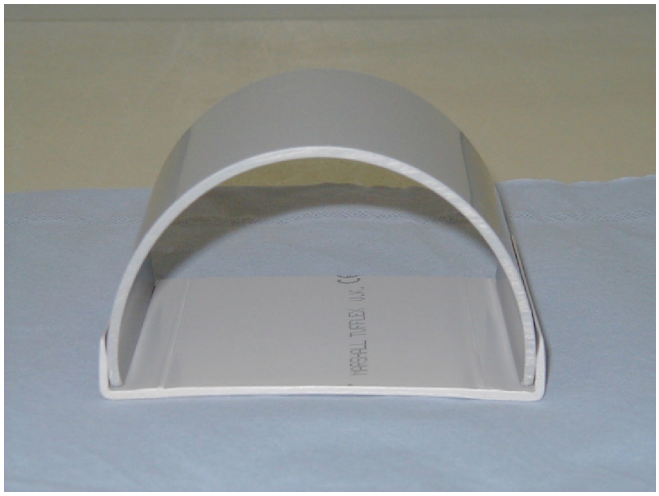
▼M7

Dodatak 4.B

SUPSTRAT ZA MRIJEŠĆENJE DEBELOGLAVE GAVČICE

Dvije ili tri kombinirane pločice i ladice za mrijest od plastike/keramike/stakla ili nehrđajućeg čelika smještaju se u svaku ispitnu komoru (primjerice sivi polukružni oluk dužine 80 mm koji se nalazi na ladici U-profila dugačkoj 130 mm) (vidjeti sliku). Pravilno pripremljene plastične ili keramičke pločice pokazale su se prikladnima za supstrat za mriješćenje (Thorpe *et al*. 2007).

Preporučuje se abrazija pločica kako bi se poboljšalo prianjanje. Ladicu treba pregledati kako bi se ribama spriječio pristup palim jajašcima, osim ako je prianjanje jajašaca dokazano za primijenjeni supstrat za mriješćenje.



Podloga služi zadržavanju svih jajašaca koja se nisu prilijepila za površinu pločice i koja bi pala na dno akvarija (ili jajašaca koja su položena izravno na ravnu plastičnu podlogu). Sve supstrate za mriješćenje prije upotrebe potrebno je ispirati u vodi za razrjeđivanje najmanje 12 sati.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90. – 98.

▼M7

Dodatak 5.A

PROCJENA SEKUNDARNIH SPOLNIH OBILJEŽJA U DEBELOGLAVE GAVČICE RADI OTKRIVANJA ODREĐENIH ENDOKRINO AKTIVNIH KEMIKALIJA

Pregled

Potencijalno važna obilježja fizičkog izgleda u odraslih debeloglavih gavčica pri ispitivanju endokrinih disruptora uključuju boju tijela (svijetlu/tamnu boju), uzorke boje (postojanje ili izostanak okomitih pruga), oblik tijela (oblik glave i prsnog područja, zaobljenost abdomena) te posebna sekundarna spolna obilježja (broj i veličinu izraslina spolno zrelih riba, veličinu zadebljanja ispred leđne peraje i leglice).

Izrasline se nalaze na glavi (zadebljanju ispred leđne peraje) reproduktivno aktivnih mužjaka debeloglave gavčice te su u pravilu raspoređene u bočno simetričnom uzorku (Jensen *et al.* 2001). U ženki iz kontrolnih skupina i mladih mužjaka i ženki nije uočen razvoj izraslina (Jensen *et al*. 2001). Moguća je pojava do osam pojedinačnih izraslina oko očiju i između nosnica mužjaka. Najviše izraslina i najveće izrasline nalaze se u dvjema usporednim linijama neposredno ispod nosnica i iznad usta. U brojnih riba skupine izraslina nalaze se ispod donje čeljusti; jedan par izraslina u pravilu se nalazi najbliže ustima, dok se dalje prema trbuhu mogu nalaziti do četiri izrasline. Stvarni broj izraslina rijetko premašuje 30 (raspon od 18 do 28; Jensen *et al*. 2001). Dominantne izrasline (u brojčanom smislu) prisutne su kao jedinstvena, relativno okrugla struktura čija je visina približno jednaka polumjeru. Većina reproduktivno aktivnih mužjaka ima i barem nekoliko izraslina koje su uvećane i izražene tako da ih je nemoguće razlikovati kao pojedinačne strukture.

Neke vrste endokrino disruptivnih kemikalija mogu prouzročiti neuobičajenu pojavu određenih sekundarnih spolnih obilježja u suprotnog spola; primjerice, agonisti receptora za androgene, poput 17α-metiltestosterona ili 17β-trenbolona, mogu prouzročiti razvoj izraslina u ženki debeloglave gavčice (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003.), dok agonisti receptora za estrogene mogu prouzročiti smanjenje broja ili veličine izraslina u mužjaka (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

U nastavku se nalazi opis obilježja izraslina u spolno zrelih debeloglavih gavčica na temelju postupaka koji se primjenjuju u laboratoriju američke Agencije za zaštitu okoliša u Duluthu, Minnesota. Posebne proizvode i/ili opremu moguće je zamijeniti sličnim dostupnim materijalima.

Najbolji je pregled s pomoću osvijetljenog povećala ili stereoskopskog mikroskopa s osvjetljenjem i lećom objektiva od 3x. Promatrajte leđa i glave riba (glava prema gledatelju).

— Smjestite ribe u malu Petrijevu zdjelicu (primjerice promjera 100 mm) glavom prema naprijed i trbuhom prema dolje. Usmjerite tražilo kako biste prepoznali izrasline. Nježno i polako okrećite ribe s jedne na drugu stranu kako biste pronašli izrasline. Izbrojite i ocijenite izrasline.

— Pregledajte površinu trbušne strane glave tako da ribu u Petrijevoj zdjelici smjestite leđima prema naprijed.

— Promatranje svake ribe trebalo bi trajati najviše dvije minute.

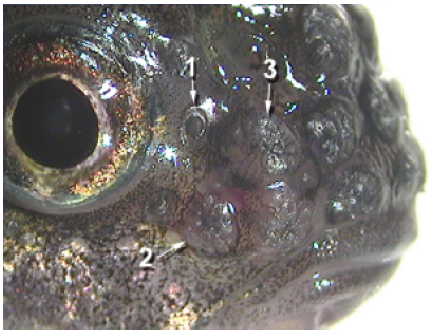
▼M7

Brojanje i ocjenjivanje izraslina

Utvrđeno je šest posebnih područja za ocjenu pojave i razvoja izraslina u odraslih debeloglavih gavčica. Izrađen je obrazac za evidentiranje mjesta i broja izraslina (vidjeti završetak ovog Dodatka). Broj se izraslina evidentira, a njihova se veličina ocjenjuje kao: 0 – izostanak, 1 – prisutne, 2 – uvećane i 3 – izražene za svaki organizam (slika 1.).

Ocjena 0 – izostanak izraslina. Ocjena „1 – prisutne” odnosi se na sve izrasline s jednostrukim vrhom čija je visina gotovo jednaka polumjeru. Ocjena „2 – uvećane” odnosi se na tkivo koje nalikuje zvjezdici i koje u pravilu ima veliku radijalnu osnovu s udubinama i brazdama koje se izdižu iz središta. Vrh izrasline često je više nazubljen, ali u nekim slučajevima može biti i zaobljen. Ocjena „3 – izražene” odnosi se na prilično velike i zaobljene izrasline slabije definirane strukture. Te će izrasline u nekim slučajevima tvoriti jedinstvenu tvorbu duž jednog ili kombinacije područja (B, C i D, prema opisu u nastavku). Boja i uzorak nalikuju ocjeni 2, ali su u nekim slučajevima prilično neodređeni. Posljedica će primjene ovog sustava ocjenjivanja biti ukupne ocjene izraslina < 50 u normalnog kontrolnog mužjaka koji ima od 18 do 20 izraslina (Jensen *et al*. 2001).

Slika 1.



Stvarni broj izraslina u nekih riba može premašivati broj polja u obrascu za određeno područje ocjenjivanja. U tom slučaju moguće je dodatne ocjene navesti desno ili lijevo od polja. Stoga obrazac ne treba biti simetričan. Dodatna metoda mapiranja izraslina koje su u paru ili se nalaze u skupinama duž horizontalne ravnine usta jest dvostruko označavanje dviju točaka za ocjenjivanje izraslina u jednom polju.

Područja mapiranja:

A – izrasline oko očiju. Nalaze se s leđne i trbušne strane oko prednjeg ruba oka. Često višestruke u zrelih mužjaka iz kontrolnih skupina, nisu prisutne u ženki iz kontrolnih skupina, u pravilu u paru (po jedna blizu svakog oka) ili pojedinačne u ženki izloženih androgenima.

B-izrasline između nosnica (pora osjetilnih kanala). U pravilu u parovima u mužjaka iz kontrolnih skupina na višim stadijima (2 – uvećane ili 3 – izražene) razvoja. Izraslina nema u ženki iz kontrolnih skupina, dok je u ženki izloženih androgenima uočena njihova pojava i razvoj.

C – izrasline neposredno ispred nosnica, paralelno s ustima. U pravilu uvećane ili izražene u zrelih mužjaka iz kontrolnih skupina. Prisutne ili uvećane u slabije razvijenih mužjaka ili ženki tretiranih androgenima.

▼M7

D – izrasline smještene paralelno duž linije ustiju. U pravilu se ocjenjuju kao razvijene u mužjaka iz kontrolnih skupina. Nema ih u ženki iz kontrolnih skupina, ali su prisutne u ženki izloženih androgenima.

E – izrasline na donjoj čeljusti, blizu usta, u pravilu malene i obično u parovima. Njihova pojava varira u mužjaka iz kontrolnih skupina, tretiranih mužjaka i tretiranih ženki.

F – izrasline s trbušne strane u odnosu na E. Obično malene i u parovima. Prisutne u mužjaka iz kontrolnih skupina i ženki izloženih androgenima.

LITERATURA

1. Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

2. Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

3. Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

4. Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

5. Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

6. Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

7. Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Obrazac za ocjenu izraslina:

Oznaka _____

Datum _____

Ukupan broj bodova ___

Brojčana ocjena

1 – prisutne

2 – uvećane

3 – izražene

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Dodatak 5.B

PROCJENA SEKUNDARNIH SPOLNIH OBILJEŽJA U MEDAKE RADI OTKRIVANJA ODREĐENIH ENDOKRINO AKTIVNIH KEMIKALIJA

U nastavku se opisuje mjerenje papilarnih procesa ([1]) koji su sekundarno spolno obilježje u medake (*Oryzias latipes*).

(1) Nakon vađenja jetre (Dodatak 6.) truplo se stavlja u epruvetu s približno 10 ml 10-postotnog neutralnog puferiranog formalina (glavom prema gore i repom prema dolje). Ako je gonada fiksirana u otopini koja nije 10-postotni neutralni puferirani formalin, s pomoću skalpela napravite poprečni rez preko trupla između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa, pazeći pritom da ne oštetite gonoporu i samu gonadu (slika 3.). Stavite glavu s prednjim dijelom ribe u otopinu za fiksiranje radi očuvanja gonade, a repni dio u 10-postotni neutralni puferirani formalin prema prethodnom opisu.

(2) Nakon što ste ribu stavili u 10-postotni neutralni puferirani formalin, pincetom uhvatite prednji dio podrepne peraje i držite ga presavijenog oko 30 sekundi kako biste raširili podrepnu peraju. Pri hvatanju podrepne peraje pincetom uhvatite i nekoliko šipčica peraje u prednjem dijelu, pazeći pritom da ne ogrebete papilarne procese.

(3) Nakon što je podrepna peraja bila raširena 30 sekundi, pohranite tijelo ribe u 10-postotni neutralni puferirani formalin na sobnoj temperaturi do mjerenja papilarnih procesa (mjerenje je potrebno provesti nakon najmanje 24-satnog fiksiranja).

Mjerenje

(1) Nakon fiksiranja tijela ribe u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalinu u trajanju od najmanje 24 sata, izvadite truplo ribe iz epruvete i obrišite formalin filtarskim papirom (ili papirnatim ručnikom).

(2) Položite ribu trbuhom prema gore. Škaricama pažljivo zarežite podrepnu peraju (poželjno je, osim podrepne peraje, odrezati i mali dio perajne potpore).

(3) Pincetom uhvatite prednji dio odrezane podrepne peraje i stavite ga na stakalce s nekoliko kapi vode. Potom podrepnu peraju pokrijte pokrivnim stakalcem. Pazite da pri hvatanju podrepne peraje pincetom ne ogrebete papilarne procese.

(4) Prebrojite kosti bodlje s papilarnim procesima s pomoću brojača pod biološkim mikroskopom (uspravni ili invertni mikroskop). Papilarni procesi uočavaju se kad je mala nakupina procesa vidljiva na stražnjem dijelu kosti bodlje. U obrazac zabilježite broj kosti bodlje s papilarnim procesima na

([1]) Papilarni procesi u pravilu se pojavljuju samo u odraslih mužjaka te se nalaze na šipčicama peraja od druge do sedme ili osme od stražnjeg kraja podrepne peraje (slike 1. i 2.). Međutim, procesi se rijetko nalaze na prvoj šipčici peraje od stražnjeg kraja podrepne peraje. Ovim standardnim operativnim postupkom (SOP) obuhvaćeno je mjerenje procesa na prvoj šipčici peraje (u ovom SOP-u broj šipčice peraje odnosi se na redoslijed od stražnjeg kraja podrepne peraje).

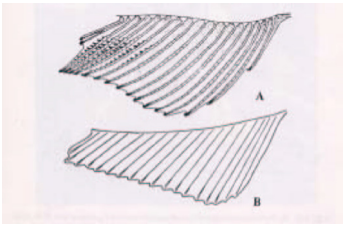
▼M7

svakoj šipčici peraje (primjerice, prva šipčica peraje: 0, druga šipčica peraje: 10, treća šipčica peraje: 12 itd.) te u tablicu u Excelu unesite zbroj tih brojeva prema pojedinačnim ribama. Po potrebi fotografirajte podrepnu peraju i na fotografiji prebrojite kosti bodlje s papilarnim procesima.

(5) Nakon mjerenja stavite podrepnu peraju u epruvetu kako je opisano u točki 1. i pohranite je.

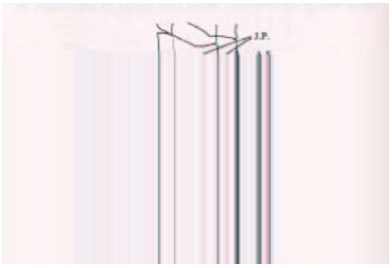
Slika 1.

Dijagram s prikazom spolnih razlika u obliku i veličini podrepne peraje. A – mužjak; B – ženka. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



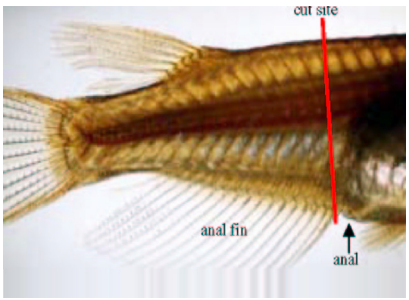
Slika 2.A

procesi na kostima bodlje šipčice podrepne peraje. J.P. – kost bodlje; A.S. – aksijalni prostor; P. – proces. B – krajnji dio šipčice peraje. Na vrhu se nalaze Actinotrichia (Act.). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Slika 3.

Fotografija tijela ribe i prikaz mjesta reza kad je gonada fiksirana u otopini za fiksiranje koja nije 10-postotni neutralni puferirani formalin. U tom slučaju ostatak tijela odrezat će se između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa s pomoću skalpela (crvena linija); glava s prednjim dijelom ribe stavit će se u otopinu za fiksiranje gonade, a repni dio u 10-postotni neutralni puferirani formalin.



▼M7

Dodatak 6.

PREPORUČENI POSTUPCI ZA UZIMANJE UZORAKA ZA ANALIZU VITELOGENINA

Potrebno je paziti da ne dođe do unakrsne kontaminacije uzoraka VTG-a mužjaka i ženki.

Postupak 1.A: Debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Nakon anestezije, korijen repa djelomično se odvaja skalpelom i uzima se krv iz repne vene/arterije s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Nakon uzimanja krvi plazma se brzo izolira centrifugiranjem pri 15 000 *g* u trajanju od tri minute (ili centrifugiranjem u trajanju od deset minuta pri 15 000 *g* na 4 °C). Postotak hematokrita može se, po želji, utvrditi nakon centrifugiranja. Plazma se potom uklanja iz mikrohematokritske cjevčice i pohranjuje u epruvetu za centrifugu uz 0,13 jedinica aprotinina (inhibitora proteaze) na – 80 °C do mogućnosti određivanja VTG-a. Ovisno o veličini debeloglave gavčice (koja ovisi o spolu), prikupljena količina plazme obično se kreće od pet do 60 mikrolitara po ribi (Jensen *et al*. 2001).

Postupak 1.B: Debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz srca

Druga je mogućnost uzimanje krvi punkcijom srca s pomoću heparinizirane šprice (1 000 jedinica heparina po ml). Krv se stavlja u Eppendorfove epruvete (koje se čuvaju na ledu) i potom centrifugira (pet minuta, 7 000 *g*, na sobnoj temperaturi). Plazmu treba premjestiti u čiste Eppendorfove epruvete (u alikvotima ako to dopušta volumen plazme) i odmah smrznuti na – 80 °C do analize (Panter *et al*. 1998).

Postupak 2.A: Japanska medaka, vađenje jetre u medake

Uklanjanje ispitne ribe iz ispitne komore

(1) Ispitnu ribu potrebno je izvaditi iz ispitne komore malom mrežom u obliku žlice. Pazite da ne ispustite ispitnu ribu u ostale ispitne komore.

(2) Ispitne ribe u pravilu je potrebno vaditi sljedećim redoslijedom: kontrola, kontrola s otapalom (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrola. Osim toga, iz ispitne komore treba izvaditi sve mužjake prije vađenja preostalih ženki.

(3) Spol ispitnih riba utvrđuje se na temelju vanjskih sekundarnih spolnih obilježja (primjerice oblika podrepne peraje).

(4) Stavite ribu u spremnik za transport i odnesite je do radne stanice radi vađenja jetre. Provjerite točnost oznaka na ispitnoj komori i spremniku za transport i provjerite je li broj riba koje su izvađene iz ispitne komore i broj riba preostalih u ispitnoj komori u skladu s očekivanjima.

(5) Ako se spol ne može utvrditi iz vanjskog izgleda riba, izvadite sve ribe iz ispitne komore. Spol je u tom slučaju potrebno utvrditi promatranjem gonade ili sekundarnih spolnih obilježja pod stereoskopskim mikroskopom.

Vađenje jetre

(1) Premjestite ispitnu ribu iz spremnika za transport u otopinu anestetika malom mrežom u obliku žlice.

▼M7

(2) Nakon anestezije pincetom (običnom) premjestite ispitnu ribu na filtarski papir (ili papirnati ručnik). Pri hvatanju ispitne ribe pincetom obuhvatite glavu kako ne bi došlo do kidanja repa.

(3) Obrišite vodu s površine ispitne ribe filtarskim papirom (ili papirnatim ručnikom).

(4) Položite ribu trbuhom prema gore. Potom škaricama napravite mali poprečni rez od leđnog dijela vrata do područja srednjeg trbuha.

(5) Umetnite škarice u mali rez i zarežite trbuh od točke sa stražnje strane škržnog plašta do prednje strane anusa duž središnje linije abdomena. Pazite da škarice ne umetnete preduboko kako ne bi došlo do oštećenja jetre i gonade.

(6) Obavite sljedeće postupke pod stereoskopskim mikroskopom.

(7) Položite ispitnu ribu trbuhom prema gore na papirnati ručnik (pri ruci moraju biti i staklena Petrijeva zdjelica ili stakalce).

(8) Proširite stijenke trbušne šupljine preciznom pincetom i izvadite unutarnje organe. Prihvatljivo je, po potrebi, i vađenje unutarnjih organa uklanjanjem jedne strane stijenke trbušne šupljine.

(9) Otkrijte spojeni dio jetre i žučnog mjehura drugom preciznom pincetom. Potom uhvatite žučni kanal i odrežite žučni mjehur. Pazite da ne dođe do trganja žučnog mjehura.

(10) Uhvatite jednjak i na isti način razdvojite probavni trakt od jetre. Pazite da ne dođe do izlijevanja sadržaja probavnog trakta. Odvojite stražnji dio probavnog trakta od anusa i izvadite ga iz trbušne šupljine.

(11) Uklonite masno tkivo i ostala tkiva s vanjskog dijela jetre. Pazite da ne ogrebete jetru.

(12) Preciznom pincetom uhvatite krvne žile uz jetru i uklonite jetru iz trbušne šupljine.

(13) Položite jetru na stakalce. Po potrebi, s površine jetre preciznom pincetom uklonite višak masnog tkiva i okolnog tkiva (primjerice trbušnu ovojnicu).

(14) Izvažite jetru s pomoću elektroničke analitičke vage i mikroepruvete od 1,5 ml kao tare. Zabilježite vrijednost u obrazac (očitanje: 0,1 mg). Potvrdite podatke o identifikaciji na naljepnici mikroepruvete.

(15) Zatvorite poklopac mikroepruvete u kojoj se nalazi jetra. Pohranite je u stalak za hlađenje (ili stalak s ledom).

(16) Nakon vađenja jedne jetre instrumente očistite ili ih zamijenite čistima.

▼M7

(17) Izvadite jetre svim ribama u spremniku za transport kako je prethodno opisano.

(18) Nakon vađenja jetara svim ribama u spremniku za transport (odnosno svim mužjacima ili ženkama u ispitnoj komori) stavite sve uzorke jetara u stalak za epruvete s identifikacijskom oznakom i pohranite ih u zamrzivač. U slučaju uzimanja jetara za preliminarno tretiranje ubrzo nakon vađenja primjerci se do sljedeće radne stanice nose u stalku za hlađenje (ili stalku s ledom).

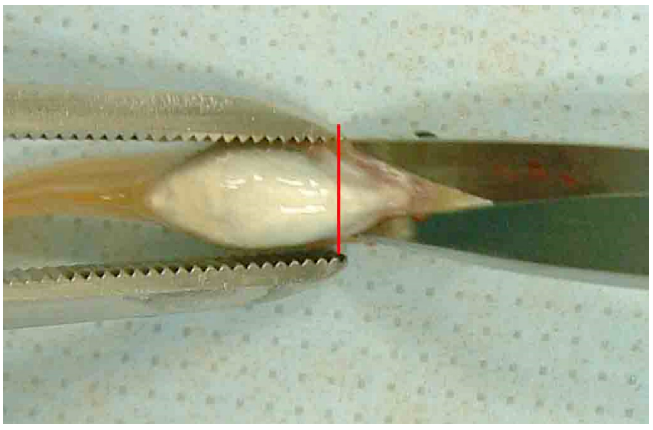
Nakon vađenja jetre truplo ribe podvrgava se histološkoj pretrazi gonade i mjerenju sekundarnih spolnih obilježja.

Uzorak

Pohranite uzorke jetara ispitnih riba na ≤ – 70 °C ako se ne podvrgavaju preliminarnom tretiranju ubrzo nakon vađenja.

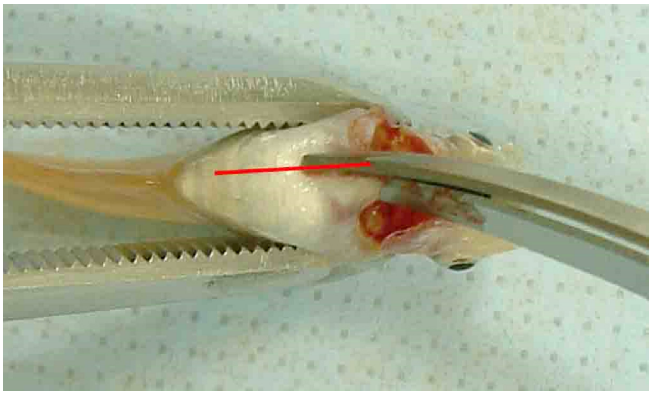
Slika 1.

Škarama se načini rez neposredno ispred prsnih peraja.



Slika 2.

Škarama se razreže središnja linija abdomena do točke približno 2 mm od kranijalne strane anusa.



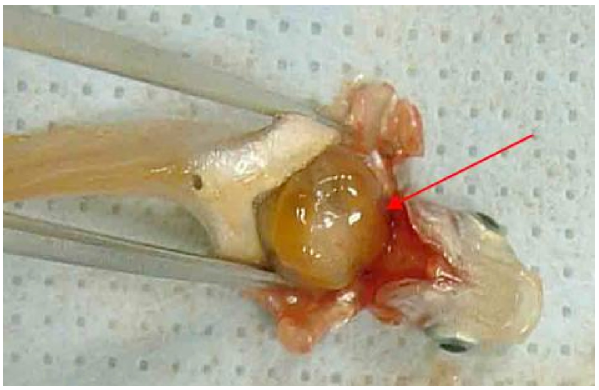
▼M7

Slika 3.

Pincetom se trbušne stijenke šire radi vađenja jetre i ostalih unutarnjih organa.

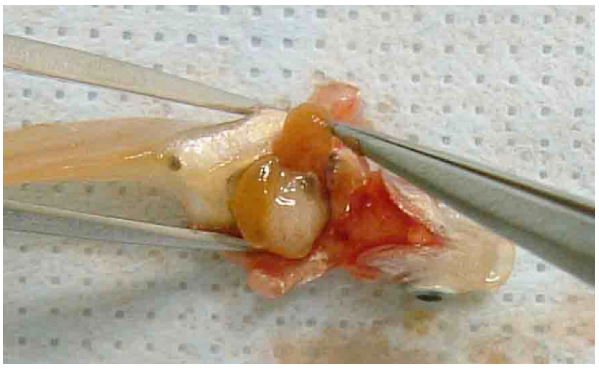
(Druga je mogućnost bočno pričvrstiti trbušne stijenke).

Strelica pokazuje jetru.



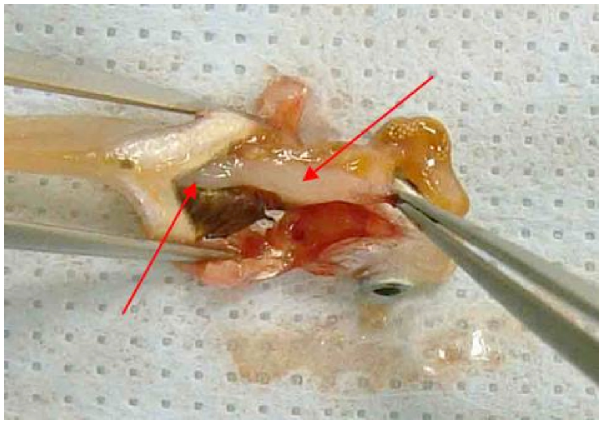
Slika 4.

Jetra se izrezuje i vadi s pomoću pincete.



Slika 5.

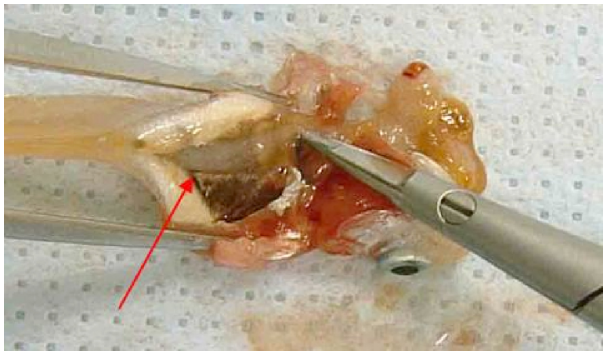
Crijeva se nježno povlače pincetom.



▼M7

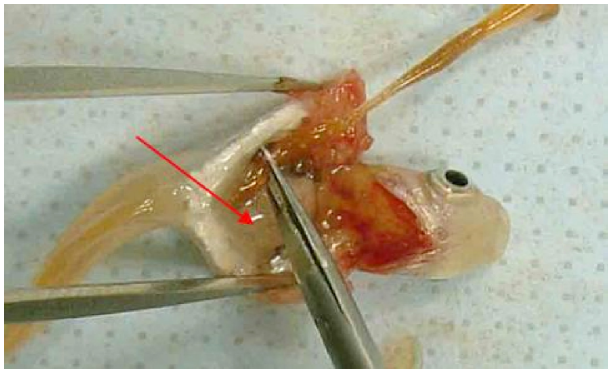
Slika 6.

Škarama se režu oba kraja crijeva i sva mezenterička vezivna tkiva.



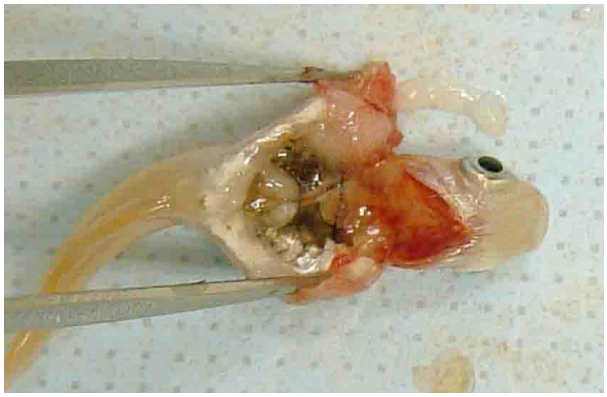
Slika 7. (ženka)

Postupak je jednak za ženke.



Slika 8.

Kraj postupka.



▼M7

Postupak 2.B: Japanska medaka (*Oryzias latipes*), preliminarno tretiranje jetre za analizu vitelogenina

Uzmite bocu homogenizacijskog pufera iz kompleta za analizu ELISA i ohladite je smrvljenim ledom (temperatura otopine: ≤ 4 °C). U slučaju upotrebe homogenizacijskog pufera iz sustava EnBio ELISA otopite otopinu na sobnu temperaturu, a potom bocu ohladite smrvljenim ledom.

Izračunajte volumen homogenizacijskog pufera za jetru na temelju njezine mase (dodajte 50 µl homogenizacijskog pufera po mg mase jetre). Primjerice, ako masa jetre iznosi 4,5 mg, volumen homogenizacijskog pufera za jetru iznosi 225 µl. Sastavite popis volumena homogenizacijskog pufera za sve jetre.

Priprema jetre za preliminarno tretiranje

(1) Neposredno prije tretiranja iz zamrzivača izvadite mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

(2) Preliminarno tretiranje jetre mužjaka potrebno je obaviti prije ženki kako bi se izbjegla kontaminacija vitelogeninom. Osim toga, preliminarno tretiranje ispitnih skupina potrebno je obaviti sljedećim redoslijedom: kontrola, kontrola s otapalom (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrola.

(3) Broj mikroepruveta od 1,5 ml s uzorcima jetara izvađenih iz zamrzivača u određenom trenutku ne smije premašiti broj mikroepruveta koje je moguće istovremeno centrifugirati.

(4) Poredajte mikroepruvete od 1,5 ml s uzorcima jetara prema redoslijedu broja primjerka na stalku s ledom (jetre ne treba otapati).

Postupak preliminarnog tretiranja

1) Dodavanje pufera za homogenizaciju

Provjerite popis kako biste utvrdili koji je volumen homogenizacijskog pufera potrebno upotrijebiti za određeni uzorak jetre i podesite mikropipetu (raspon volumena: 100 – 1 000 µl) na odgovarajući volumen. Na mikropipetu stavite čisti vrh.

Uzmite homogenizacijski pufer iz boce s reagensom i dodajte pufer u mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

Dodajte homogenizacijski pufer u sve mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi jetra prema prethodno opisanom postupku. Vrh mikropipete nije potrebno zamijeniti novim. Međutim, vrh je potrebno zamijeniti ako je kontaminiran ili se sumnja na kontaminaciju.

2) Homogenizacija jetre

— Na homogenizator mikroepruveta stavite novi tučak za homogenizaciju.

— Stavite tučak u mikroepruvetu od 1,5 ml. Držite homogenizator mikroepruveta tako da jetru pritišćete između površine tučka i unutarnje stijenke mikroepruvete od 1,5 ml.

— Uključite homogenizator mikroepruveta na 10 do 20 sekundi. Tijekom postupka hladite mikroepruvetu od 1,5 ml smrvljenim ledom.

▼M7

— Izvadite tučak iz mikroepruvete i odložite je na približno deset sekundi. Potom vizualnim pregledom utvrdite stanje suspenzije.

— Ako su u suspenziji vidljivi djelići jetre, ponovite postupke 3. i 4. kako biste pripremili zadovoljavajući homogenat jetre.

— Ohladite suspendirani homogenat jetre na stalku s ledom do centrifugiranja.

— Zamijenite tučak novim za svaki homogenat.

— Homogenizirajte sve jetre homogenizacijskim puferom prema prethodno opisanom postupku.

3) Centrifugiranje suspendiranog homogenata jetre

— Provjerite je li temperatura rashlađene komore za centrifugiranje ≤ 5 °C.

— Stavite mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi suspendirani homogenat jetre u rashlađenu centrifugu (po potrebi prilagodite ravnotežu).

— Centrifugirajte suspendirani homogenat jetre deset minuta pri 13 000 *g* na ≤ 5 °C. Međutim, u slučaju pravilne separacije supernatanta centrifugalnu silu i vrijeme moguće je prilagoditi po potrebi.

— Nakon centrifugiranja provjerite jesu li supernatanti pravilno separirani (površina: lipidi, sredina: supernatant, donji sloj: tkivo jetre). U slučaju nepravilne separacije suspenziju ponovno centrifugirajte u istim uvjetima.

— Iz rashlađene centrifuge izvadite sve uzorke i poredajte ih prema broju uzorka na stalku s ledom. Pazite da nakon centrifugiranja ne dođe do ponovne suspenzije separiranih slojeva.

4) Vađenje supernatanta

— U stalak za epruvete stavite četiri mikroepruvete od 0,5 ml za pohranu supernatanta.

— Mikropipetom izvadite 30 µl svakog supernatanta (separiranog kao srednji sloj) i stavite u jednu mikroepruvetu od 0,5 ml. Pazite da ne zahvatite lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

— Izvadite supernatant i stavite ga u druge dvije mikroepruvete od 0,5 ml na prethodno opisani način.

— Mikropipetom izvadite ostatak supernatanta (po mogućnosti: ≥ 100 µl). Potom ga stavite u preostalu mikroepruvetu od 0,5 ml. Pazite da ne zahvatite lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

— Zatvorite poklopac mikroepruvete od 0,5 ml i na naljepnicu zapišite volumen supernatanta. Mikroepruvete potom odmah ohladite na stalku s ledom.

— Zamijenite vrh mikropipete novim za svaki supernatant. Ako se na vrhu nakupi velika količina lipida, odmah ga promijenite kako ne bi došlo do kontaminacije ekstrakta jetre mašću.

▼M7

— Stavite sav centrifugirani supernatant u četiri mikroepruvete od 0,5 ml prema prethodno opisanom postupku.

— Sve mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant stavite u stalak za epruvete s identifikacijskim oznakama i potom ih odmah zamrznite u zamrzivaču. U slučaju mjerenja koncentracija VTG-a neposredno nakon preliminarnog tretiranja ostavite jednu mikroepruvetu od 0,5 ml (u kojoj se nalazi 30 µl supernatanta) da se hladi u stalku za epruvete i odnesite je do radne stanice gdje se provodi test ELISA. U tom slučaju stavite preostale mikroepruvete u stalke za epruvete i zamrznite ih u zamrzivaču.

— Nakon vađenja supernatanta ostatke zbrinite na odgovarajući način.

Čuvanje uzorka

Mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant homogenata jetre čuvajte na ≤ –70 °C do upotrebe za test ELISA.

Postupak 3.A: Zebrica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Neposredno nakon anestezije korijen repa poprečno se zarezuje i uzima se krv iz repne arterije/vene s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Volumen krvi kreće se od pet do 15 mikrolitara ovisno o veličini ribe. Jednaki volumen pufera aprotinina (6 mikrograma/ml u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom) dodaje se u mikrokapilarnu cjevčicu, a plazma se centrifugiranjem odvaja od krvi (pet minuta pri 600 *g*). Plazma se stavlja u ispitne epruvete i čuva na – 20 °C do analize VTG-a ili ostalih proteina koji mogu biti od interesa.

Postupak 3.B: Zebrica, uzimanje krvi punkcijom srca

Kako bi se izbjeglo zgrušavanje krvi i propadanje proteina, uzorci se uzimaju u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom koja sadržava heparin (1 000 jedinica/ml) i aprotinin (inhibitor proteaze) (2 TIU/ml). Kao sastojci za pufer preporučuju se heparin, amonijeva sol i liofilizirani aprotinin. Za uzimanje uzorka krvi preporučuje se šprica (1 ml) s fiksnom tankom iglom (primjerice Braun Omnican-F). Špricu je potrebno prethodno napuniti puferom (približno 100 mikrolitara) kako bi se iz svake ribe u potpunosti eluirale male količine krvi. Uzorci krvi uzimaju se punkcijom srca. Ribi je prvo potrebno dati anestetik MS-222 (100 mg/l). Pri odgovarajućem stupnju anestezije korisnik može vidjeti otkucaje srca zebrice. Pri punkciji srca klip šprice treba biti blago napet. Izvađene količine krvi kreću se od 20 do 40 mikrolitara. Nakon punkcije srca smjesu krvi i pufera potrebno je staviti u ispitnu epruvetu. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem (20 minuta; 5 000 *g*) i do analize čuva na – 80 °C.

Postupak 3.C: SOP: Zebrica, homogenizacija glave i repa

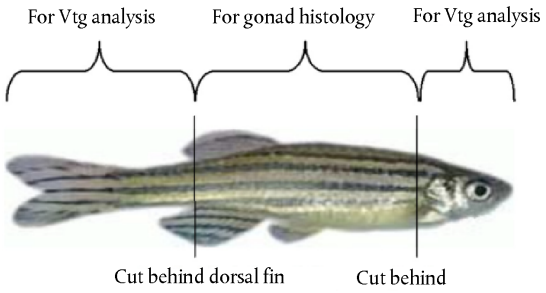
1. Ribe se anesteziraju i usmrćuju u skladu s opisom ispitivanja.

2. Glava i rep režu se u skladu sa slikom 1.

Važno: *Sve instrumente za seciranje i podlogu za rezanje potrebno je pravilno isprati i očistiti (primjerice 96-postotnim etanolom) između rukovanja svakom ribom kako bi se spriječilo da ženke ili inducirani mužjaci kontaminiraju neinducirane mužjake vitelogeninom*.

▼**M7**

Slika 1.



3. Težina odrezane glave i repa svake ribe mjeri se do najbližeg miligrama.

4. Dijelovi se nakon vaganja stavljaju u odgovarajuće epruvete (primjerice Eppendorfove epruvete od 1,5 ml) i zamrzavaju na – 80 °C do homogenizacije ili izravno homogeniziraju na ledu s pomoću dvaju plastičnih tučaka. (Ostale se metode mogu primjenjivati ako se provode na ledu, a rezultat je homogena smjesa). Važno: *Epruvete je potrebno pravilno označiti brojevima kako bi se glava i rep mogli povezati s pripadajućim tijelom koje se upotrebljava za histološku pretragu gonade.*

5. Kad se dobije homogena smjesa, dodaje se (težinski) četiri puta toliko ledeno hladnog **pufera za homogenizaciju** ([1]). Nastavite raditi s tučcima dok smjesa ne postane homogena. Važna napomena: *Za svaku se ribu upotrebljavaju novi tučci.*

6. Uzorci se stavljaju na led do centrifugiranja na **4 °C** pri 50 000 *g* 30 minuta.

7. Pipetom stavite 20 µl supernatanta u **najmanje dvije** epruvete tako da vrh pipete umočite ispod površinskog sloja masti i pažljivo usišite supernatant bez masti ili dijelova taloga.

8. Epruvete se do upotrebe čuvaju na – 80 °C.

([1]) Pufer za homogenizaciju:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-postotni koktel inhibitora proteaze (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktela inhibitora proteaze.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), primjerice proizvođača Bie & Berntsen, Danska.
— Koktel inhibitora proteaze: proizvođača Sigma (za tkivo sisavaca), broj proizvoda P 8340.
NAPOMENA: Pufer za homogenizaciju treba upotrijebiti na dan proizvodnje. Tijekom upotrebe držite na ledu.

▼M7

Dodatak 7.

UZORCI S POJAČANOM RAZINOM VITELOGENINA I REFERENTNI STANDARD MEĐU TESTOVIMA

Svakog dana provođenja testova VTG-a analizirat će se uzorak s pojačanom razinom izrađen s pomoću referentnog standarda među testovima. VTG za izradu referentnog standarda među testovima bit će iz različite šarže od one za izradu standarda kalibracije za provođenje testa.

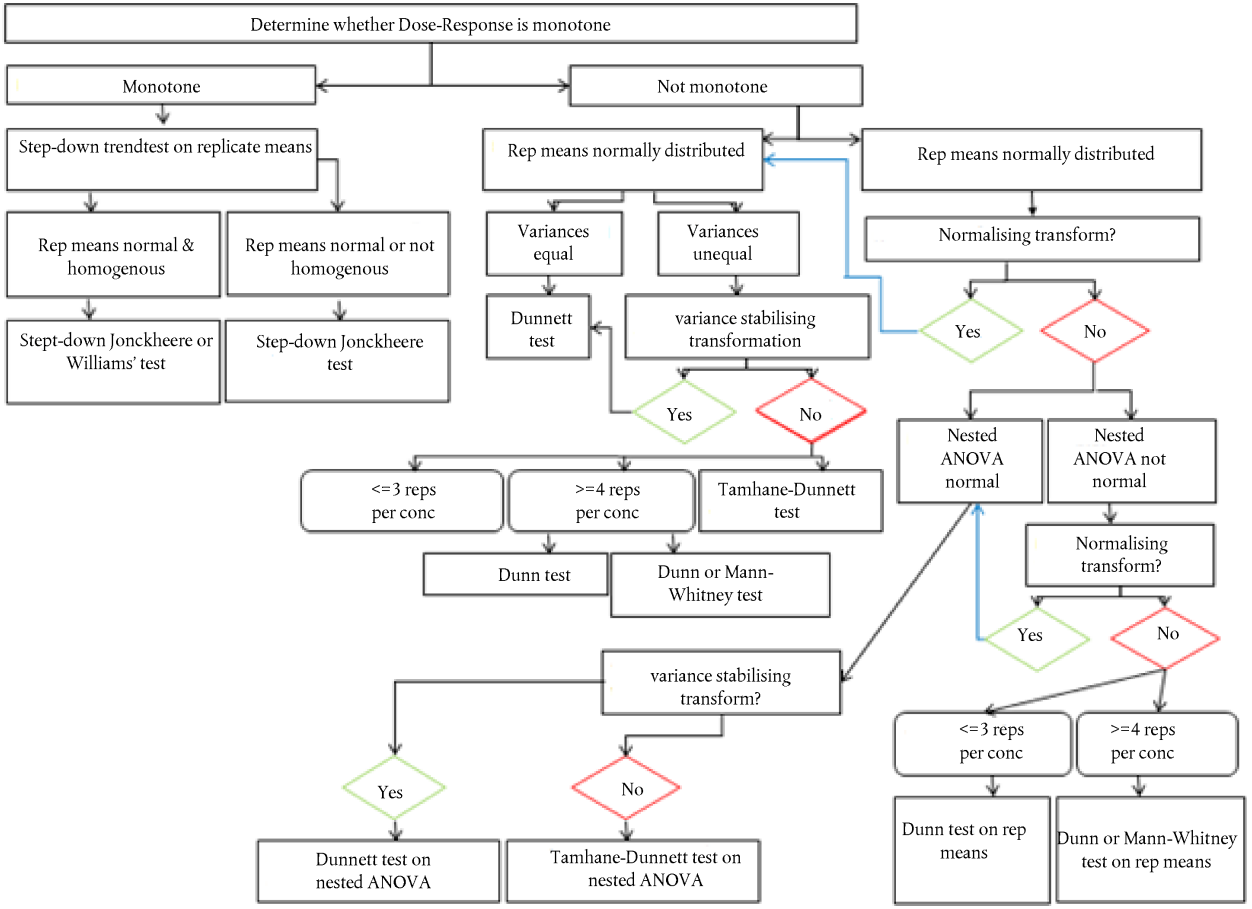
Uzorak s pojačanom razinom izradit će se dodavanjem poznate količine standarda među testovima uzorku plazme kontrolnih mužjaka. Uzorak se pojačava radi postizanja koncentracije VTG-a koja je od 10 do 100 puta veća od očekivane koncentracije vitelogenina u kontrolnih mužjaka riba. Uzorak plazme kontrolnih mužjaka koji se pojačava može potjecati od jedne ribe ili nekoliko riba.

Poduzorak nepojačane plazme kontrolnih mužjaka analizirat će se u najmanje dva dvostruka bunarića. I pojačani uzorak analizirat će se u najmanje dva dvostruka bunarića. Srednja količina vitelogenina iz dva nepojačana uzorka plazme kontrolnih mužjaka dodat će se izračunanoj količini VTG-a koja je dodana uzorcima s pojačanom razinom; na taj se način određuje očekivana koncentracija. Omjer te očekivane i izmjerene koncentracije bilježit će se uz rezultate svakog kompleta testova provedenog tog dana.

▼M7

Dodatak 8.

GRAFIKON ODLUKE ZA STATISTIČKU ANALIZU



▼M7

C.49. ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA RIBLJIM EMBRIJIMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 236 (2013.). Njome se opisuje ispitivanje akutne toksičnosti na embrijima zebrica (*Danio rerio*). Ispitivanje je namijenjeno za određivanje akutne toksičnosti kemikalija na ribama u embrionalnom stadiju. Ono se temelji na studijama i provjerama provedenima na zebricama (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14.). Uspješno se primjenjuje na niz kemikalija različitih načina djelovanja te različite topljivosti, hlapljivosti i hidrofobnosti (ispitano u 15. i 16.).

2. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

3. Netom oplođena jajašca zebrica izlažu se ispitivanoj kemikaliji 96 sati. Svaka 24 sata bilježe se do četiri apikalna zapažanja kao pokazatelji smrtonosnog djelovanja (6.): i. koagulacija oplođenih jajašaca, ii. izostanak formiranja somita, iii. neodvajanje korijena repa od žumanjčane vrećice i iv. izostanak otkucaja srca. Na kraju razdoblja izlaganja utvrđuje se akutna toksičnost na temelju pozitivnog ishoda bilo kojega od četiri apikalna zapažanja te se izračunava LC_{50} (srednja smrtonosna koncentracija).

POČETNA RAZMATRANJA

4. Korisne informacije o specifičnim svojstvima tvari uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlosti, pK_a i K_{ow}, topljivost u vodi, tlak pare i rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili ispitna metoda C.29. (18.)). Topljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na temelju koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane kemikalije. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama s utvrđenom i dokumentiranom točnošću i granicom otkrivanja.

5. Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje smjese, potrebno je što više informacija o sastavu smjese, npr. o kemijskom identitetu njezinih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i specifičnim svojstvima (vidjeti stavak 4.). Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.

6. Kad je riječ o tvarima koje se mogu aktivirati u metabolizmu, postoje dokazi da embriji zebrica imaju sposobnost biotransformacije (19., 20., 21., 22.). Međutim, metaboličke sposobnosti riba u embrionalnom stadiju ne odgovaraju uvijek onima mladih ili odraslih riba. Primjerice, u ispitivanju akutne toksičnosti na ribljim embrijima za protoksičnu tvar alil-alkohol nije utvrđeno da je toksična (9.). Stoga se, ako postoje ikakve naznake da bi metaboliti ili drugi značajni produkti transformacije mogli biti toksičniji od matičnog sastojka, preporučuje provesti ispitivanje i s tim metabolitima / produktima transformacije te uključiti i te rezultate pri zaključivanju o toksičnosti ispitivane kemikalije, ili provesti još jedno ispitivanje u kojemu se pomnije razmatra metabolizam.

7. Za tvari molekularne mase $\geq$ 3 kDa, tvari vrlo krupne molekularne strukture i tvari koje uzrokuju odgođeno valjenje, čime bi se moglo onemogućiti ili smanjiti izlaganje nakon valjenja, zbog ograničene bioraspoloživosti tih tvari očekuje se neosjetljivost embrija, pa bi druga ispitivanja toksičnosti mogla biti prikladnija.

▼M7

VALJANOST ISPITIVANJA

8. Za valjanost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći kriteriji:

a) od prikupljenih jajašaca u ispitnoj šarži trebalo bi biti oplođeno ≥ 70 %;

b) temperatura vode u ispitnim komorama trebala bi se održavati na 26 ± 1 °C tijekom cijelog ispitivanja;

c) u negativnoj kontroli (s vodom za razrjeđivanje) te, prema potrebi, u kontroli s otapalom trebalo bi preživjeti ukupno ≥ 90 % embrija u 96 sati izlaganja;

d) izlaganje pozitivnoj kontroli (npr. 4,0 mg/l 3,4-dikloroanilina za zebrice) trebalo bi rezultirati smrtnošću od najmanje 30 % nakon 96 sati izlaganja;

e) stopa valjenja u negativnoj kontroli (i, prema potrebi, kontroli s otapalom) trebala bi biti ≥ 80 % nakon 96 sati izlaganja;

f) nakon 96 sati izlaganja koncentracija otopljenog kisika u negativnoj kontroli i najviša ispitna koncentracija trebale bi biti zasićenosti ≥ 80 %.

OPIS METODE

9. U Dodatku 2. je pregled preporučenih uvjeta držanja i ispitivanja.

Oprema

10. Potrebna je sljedeća oprema:

a) akvariji od kemijski inertnog materijala (npr. stakla) i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučenu količinu punjenja (vidjeti „Držanje uzgojnih riba”, stavak 14.);

b) invertni mikroskop i/ili binokularni mikroskop s povećanjem od barem 80 puta. Ako se temperatura prostorije u kojoj se bilježe zapažanja ne može prilagoditi na 26 ± 1 °C, treba upotrijebiti pokretni stolić mikroskopa s kontrolom temperature ili druge metode za održavanje potrebne temperature;

c) ispitne komore; npr. standardne ploče s 24 bunarića dubine oko 20 mm (vidjeti „Ispitne komore”, stavak 11.);

d) sredstvo kao što je samoljepljiva folija za pokrivanje ploča s 24 bunarića;

e) inkubator ili prostorija s kontroliranom temperaturom kako bi se u bunarićima (ili u ispitnim komorama) mogla održati temperatura od 26 ± 1 °C;

f) mjerač pH-vrijednosti;

g) mjerač kisika;

h) oprema za određivanje tvrdoće vode i vodljivosti;

i) ladica za mrijest: pladnjevi od stakla, nehrđajućeg čelika ili nekog drugog inertnog materijala; žičana mrežica (veličine oka 2 ± 0,5 mm) od nehrđajućeg čelika ili drugog inertnog materijala za zaštitu položenih jajašaca; supstrat za mriješćenje (npr. umjetne biljke od inertnog materijala) (ispitna metoda C.48., Dodatak 4.a (23.));

j) pipete s proširenim otvorima za sakupljanje jajašaca;

▼M7

k) staklene posude za pripremu različitih ispitnih koncentracija i vode za razrjeđivanje (čaše, graduirane tikvice, graduirani cilindri i graduirane pipete) ili za prikupljanje jajašaca zebrica (npr. laboratorijske čaše, zdjelice za kristalizaciju);

l) ako se u ispitivanju primjenjuju alternativni sustavi izlaganja, kao što su protočno ispitivanje (24.) ili pasivno doziranje (25.), potrebni su odgovarajući prostori i oprema.

Ispitne komore

11. Trebalo bi upotrebljavati staklene ili polistirenske ispitne komore (npr. ploče s 24 bunarića, od kojih svaki ima kapacitet punjenja 2,5 – 5 ml). Ako se sumnja na adsorpciju na polistiren (npr. za nepolarne, planarne tvari s visokim K_{OW}), trebalo bi upotrijebiti inertne materijale (staklo) kako bi se smanjili gubici zbog adsorpcije (26.). Ispitne komore trebale bi biti nasumično raspoređene u inkubatoru.

Voda i ispitni uvjeti

12. Preporučuje se da se voda za držanje razrijedi tako da se postignu razine tvrdoće koje su tipične za niz različitih površinskih voda. Vodu za razrjeđivanje treba pripremiti od rekonstituirane vode (27.). Dobiveni stupanj tvrdoće trebao bi biti jednak 100 – 300 mg/l $CaCO_3$ kako bi se spriječilo prekomjerno taloženje kalcijeva karbonata. Mogu se upotrebljavati i druge površinske vode i izvorske vode dobro poznatih svojstava. Rekonstituirana voda može se prilagoditi vodi za držanje male tvrdoće razrjeđivanjem deioniziranom vodom u omjeru 1: 5 do minimalne tvrdoće od 30 – 35 mg/l $CaCO_3$. Voda se prozračuje do zasićenja kisikom prije dodavanja ispitivane kemikalije. Temperaturu u bunarićima trebalo bi održavati na 26 ± 1 °C tijekom cijelog ispitivanja. pH-vrijednost trebala bi biti između 6,5 i 8,5 te tijekom ispitivanja ne bi smjela varirati unutar tog raspona za više od 1,5 jedinica. Ako se očekuje da pH-vrijednost neće ostati unutar tog raspona, trebalo bi je podesiti prije početka ispitivanja. Podešavanje pH trebalo bi izvesti tako da ne dođe do znatne promjene koncentracije matične otopine i da se ne izazove kemijska reakcija ili taloženje ispitivane kemikalije. Za podešavanje pH u otopinama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju preporučuje se upotrijebiti klorovodik (HCl) i natrijev hidroksid (NaOH).

Ispitne otopine

13. Ispitne otopine u određenim koncentracijama mogu se pripremiti npr. razrjeđivanjem matične otopine. Matične otopine trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Ako se ispitivana kemikalija teško otapa u vodi, trebalo bi primijeniti postupke opisane u OECD-ovim Smjernicama br. 23 za postupanje s analitički zahtjevnim tvarima i smjesama (28.). Trebalo bi izbjegavati upotrebu otapala, iako će ona u nekim slučajevima možda biti potrebna kako bi se dobila matična otopina odgovarajuće koncentracije. Ako se u pripremi matične otopine upotrebljava otapalo, njegova konačna koncentracija ne bi smjela biti viša od 100 µl/l i trebala bi biti jednaka u svim ispitnim posudama. Ako se upotrebljava otapalo, potrebna je dodatna kontrola s otapalom.

Držanje uzgojnih riba

14. Za proizvodnju jajašaca uzimaju se uzgojne neizlagane zebrice divljeg tipa s dobro dokumentiranom stopom oplodnje jajašaca. Ribe ne bi smjele imati makroskopski vidljive simptome infekcije ili bolesti niti biti podvrgnute ikakvom farmaceutskom tretmanu (akutnom ili profilaktičkom) tijekom dva

▼M7

mjeseca prije mriješćenja. Uzgojne ribe drže se u akvariju s preporučenim kapacitetom punjenja od 1 l vode po ribi i fiksnim fotoperiodom od 12 – 16 sati (29., 30., 31., 32., 33). Optimalnu jačinu filtriranja trebalo bi podesiti; prejako filtriranje koje uzrokuje veliko strujanje vode trebalo bi izbjegavati. Za hranjenje vidjeti Dodatak 2. Suvišno hranjenje treba izbjegavati, a kvalitetu vode i čistoću akvarija potrebno je redovito nadzirati i prema potrebi vraćati na početno stanje.

Ispitivanje osposobljenosti

15. Kao referentnu kemikaliju trebalo bi ispitati, po mogućnosti dva puta godišnje, 3,4-dikloroanilin (upotrijebljen u validacijskim studijama u 1. i 2.) u punom rasponu koncentracija-odgovora kako bi se provjerila osjetljivost soja ribe koji se upotrebljava. Svaki laboratorij koji tek počinje primjenjivati ovo ispitivanje trebao bi upotrijebiti referentnu kemikaliju. Laboratoriji mogu upotrijebiti tu kemikaliju da dokažu svoju tehničku osposobljenost za provedbu ispitivanja prije dostavljanja podataka u regulatorne svrhe.

Dobivanje jajašaca

16. Jajašca zebrica mogu se dobiti iz skupina za mriješćenje (u posebnim akvarijima za mriješćenje) ili masovnim mriješćenjem (u akvarijima za držanje). U slučaju skupina za mriješćenje mužjaci i ženke (npr. u omjeru 2: 1) uzgojne skupine stavljaju se u akvarije za mriješćenje nekoliko sati prije mraka na dan prije ispitivanja. Budući da u skupinama za mriješćenje zebrica mriješćenje povremeno može izostati, preporučuje se paralelno upotrebljavati najmanje tri akvarija za mriješćenje. Kako bi se izbjegla genetička pristranost, jajašca se sakupljaju iz najmanje tri uzgojne skupine, miješaju i nasumično odabiru.

17. Za sakupljanje jajašaca, ladice za mrijest stavljaju se u akvarije za mriješćenje ili akvarije za držanje prije mraka na dan prije ispitivanja ili prije svitanja na dan ispitivanja. Kako bi se spriječilo da odrasle zebrice pojedu jajašca, ladice za mrijest pokrivaju se inertnom žičanom mrežicom odgovarajuće veličine oka (otprilike 2 ± 0,5 mm). Ako se to smatra potrebnim, na mrežicu se mogu pričvrstiti umjetne biljke od inertnog materijala (npr. plastika ili staklo) kao podražaj za mriješćenje (3., 4., 5., 23., 35.). Trebalo bi upotrebljavati iskušane plastične materijale koji ne otpuštaju svoje sastojke u vodu (npr. ftalati). Parenje, mriješćenje i oplodnja odvijaju se u 30 minuta nakon svitanja i ladice za mrijest s prikupljenim jajašcima mogu se pažljivo izvaditi. Nakon sakupljanja jajašaca iz ladica za mrijest preporučuje se isprati ih rekonstituiranom vodom.

Razlikovanje jajašaca

18. Na 26 °C nakon otprilike 15 minuta dolazi do prvog brazdanja oplođenih jajašaca, a daljnjim istovremenim brazdanjima nastaju 4, 8, 16 i 32 stanice – blastomere (vidjeti Dodatak 3.) (35.). U tim fazama oplođena jajašca mogu se lako prepoznati po razvoju blastule.

POSTUPAK

Uvjeti izlaganja

19. Dvadeset embrija po koncentraciji (jedan embrij po bunariću) izlaže se ispitivanoj kemikaliji. Izlaganje bi trebalo biti takvo da se ± 20 % nazivne koncentracije kemikalije zadrži tijekom cijelog ispitivanja. Ako to nije moguće u statičkom sustavu, trebalo bi primijeniti prikladna razdoblja obnavljanja za polustatičko ispitivanje (npr. obnavljanje svaka 24 sata). U tom slučaju koncentracije izlaganja treba provjeriti barem u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji na početku i na kraju svakog razdoblja izlaganja (vidjeti stavak 36.). Ako se koncentracija izlaganja od ± 20 % nazivne koncentracije ne može održati, sve koncentracije treba mjeriti na početku i na kraju svakog razdoblja izlaganja (vidjeti stavak 36.). Pri obnavljanju ispitne otopine treba paziti da embriji ostanu prekriveni malom količinom

▼M7

stare ispitne otopine kako bi se izbjeglo njihovo sušenje. Plan ispitivanja može se prilagoditi kako bi se ispunili zahtjevi za ispitivanje određenih tvari (npr. protočno (24.) ili pasivno doziranje (25.) za lako razgradive ili jako adsorptivne tvari (29.), ili drugo za hlapljive tvari (36., 37.)). U svakom slučaju treba paziti da stres za embrije bude što manji. Ispitne komore trebalo bi kondicionirati s ispitnim otopinama najmanje 24 sata prije početka ispitivanja. Ispitni uvjeti sažeto su opisani u Dodatku 2.

Ispitne koncentracije

20. Obično je potrebno pet koncentracija ispitivane kemikalije koje se razlikuju za stalni faktor od najviše 2,2 da se zadovolje statistički zahtjevi. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Najviša ispitna koncentracija trebala bi, po mogućnosti, izazvati smrtnost od 100 %, a najniža ispitna koncentracija ne bi trebala imati vidljive učinke, kako je opisano u stavku 28. Ispitivanjem za utvrđivanje raspona prije glavnog ispitivanja omogućuje se odabir odgovarajućeg raspona koncentracija. Ispitivanje za utvrđivanje raspona obično se provodi s deset embrija po koncentraciji. Sljedeće upute odnose se na ispitivanje s pločama s 24 bunarića. Ako se upotrebljavaju drugačije ispitne komore (npr. male Petrijeve zdjelice) ili se ispituje više koncentracija, upute se moraju na odgovarajući način prilagoditi.

21. Pojedinosti i vizualne upute za raspodjelu koncentracija u pločama s 24 bunarića dostupne su u stavku 27. i u Dodatku 4. slici 1.

Kontrole

22. Kontrole s vodom za razrjeđivanje potrebne su i kao negativna kontrola i kao kontrola unutar ploče. Ako se primijeti više od jednog mrtvog embrija u kontroli unutar ploče, ploča se odbacuje, čime se smanjuje broj koncentracija za izračunavanje LC_{50}. Ako se cijela ploča odbaci, može biti teže procijeniti i razlikovati vidljive učinke, posebno ako je odbačena ploča kontrola s otapalom ili ploča s tretiranim embrijima. U prvom slučaju ispitivanje se mora ponoviti. U drugom slučaju gubitak cijele tretirane skupine / tretiranih skupina zbog smrtnosti u unutarnjoj kontroli može za posljedicu imati smanjivanje mogućnosti procjene učinaka i određivanja vrijednosti LC_{50}.

23. Za svaku šaržu jajašaca koja se upotrebljava za ispitivanje provodi se pozitivna kontrola s fiksnom koncentracijom od 4 mg/l 3,4-dikloroanilina.

24. Ako se upotrebljava otapalo, dodatna skupina od 20 embrija izlaže se otapalu u zasebnoj ploči s 24 bunarića te tako služi kao kontrola s otapalom. Kako bi se ispitivanje smatralo prihvatljivim, trebalo bi dokazati da otapalo nema značajne učinke na vrijeme potrebno za valjenje ni na preživljavanje niti ima bilo kakve druge štetne učinke na embrije (usp. stavak 8. točku (c)).

Početak izlaganja i trajanje ispitivanja

25. Ispitivanje treba započeti što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca i završiti nakon 96 sati izlaganja. Embriji bi trebali biti uronjeni u ispitne otopine prije nego što započne brazdanje blastodiska ili, najkasnije, do faze sa 16 stanica. Kako bi se započelo s izlaganjem što je prije moguće, najmanje dvostruki broj jajašaca potreban po skupini predviđenoj za tretiranje nasumično se odabire i prenosi u odgovarajuće koncentracije i kontrole (npr. u zdjelice za kristalizaciju od 100 ml; jajašca bi trebala biti potpuno prekrivena) najkasnije 90 minuta nakon oplodnje.

26. Iskoristiva oplođena jajašca treba u roku od 180 minuta nakon oplodnje odvojiti od neoplođenih i prenijeti u ploče s 24 bunarića koje su prethodno

▼M7

kondicionirane 24 sata i zatim ponovno napunjene s 2 ml svježe pripremljene ispitne otopine po bunariću. S pomoću stereomikroskopa (po mogućnosti povećanja ≥ 30 puta) odabiru se oplođena jajašca koja se brazdaju i pritom ne pokazuju očite nepravilnosti (npr. asimetrija, nastanak vezikula) ili ozljede koriona. Za sakupljanje i odvajanje jajašaca vidjeti Dodatak 3. slike 1. i 3. te Dodatak 4. sliku 2.

Raspodjela jajašaca u ploče s 24 bunarića

27. Jajašca se raspodjeljuju u ploče s bunarićima kako slijedi (vidjeti također Dodatak 4. sliku 1.):

— 20 jajašaca u jednu ploču za svaku ispitnu koncentraciju,

— 20 jajašaca u jednu ploču kao kontrola s otapalom (ako je potrebno),

— 20 jajašaca u jednu ploču kao pozitivna kontrola,

— 4 jajašca u svaku od navedenih ploča u vodu za razrjeđivanje kao kontrola unutar ploče,

— 24 jajašca u jednu pločicu u vodu za razrjeđivanje kao negativna kontrola.

Zapažanja

28. Apikalna zapažanja koja se provode za svaki ispitni embrij jesu sljedeća: koagulacija embrija, izostanak formiranja somita, neodvajanje repa i izostanak otkucaja srca (tablica 1.). Na temelju tih zapažanja utvrđuje se smrtnost: svaki pozitivan ishod u jednome od tih zapažanja znači da je embrij zebrice mrtav. Usto, svakodnevno se bilježi valjenje u tretiranim i kontrolnim skupinama, s početkom nakon 48 sati. Zapažanja se bilježe svaka 24 sata do kraja ispitivanja.

Tablica 1.

Apikalna zapažanja akutne toksičnosti u embrija zebrica 24 sata – 96 sati nakon oplodnje.

	Vrijeme izlaganja			
	24 sata	48 sati	72 sata	96 sati
Koagulacija embrija	+	+	+	+
Izostanak formiranja somita	+	+	+	+
Neodvajanje repa	+	+	+	+
Izostanak otkucaja srca		+	+	+

29. *Koagulacija embrija:* Koagulirani su embriji mliječno bijele boje, a pod mikroskopom izgledaju tamni (vidjeti Dodatak 5. sliku 1.). Broj koaguliranih embrija određuje se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.

30. *Izostanak formiranja somita:* Pri temperaturi od 26 ± 1 °C nakon 24 sata u embrija zebrice koji se normalno razvija formirano je 20-ak somita (vidjeti Dodatak 5. sliku 2.). U embrija koji se normalno razvija uočljivi su spontani pokreti (s jedne na drugu stranu). Spontani pokreti upućuju na formiranje somita. Nepostojanje somita bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati. Ako se somiti ne formiraju nakon 24 sata, to može biti znak općeg zastoja u razvoju. Najkasnije nakon 48 sati somiti bi trebali biti razvijeni. U protivnom se zameci smatraju mrtvima.

31. *Neodvajanje repa:* U embrija zebrice koji se normalno razvija odvajanje repa (vidjeti Dodatak 5. sliku 3.) od žumanjčane vrećice zamjećuje se nakon

▼M7

produljenja stražnjeg dijela embrionalnog tijela. Neodvajanje repa bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.

32. *Izostanak otkucaja srca:* U embrija zebrice koji se normalno razvija pri temperaturi od 26 ± 1 °C otkucaji srca zamjećuju se nakon 48 sati (vidjeti Dodatak 5. sliku 4.). Bilježenje ove krajnje točke trebalo bi provoditi posebno pažljivo jer nepravilne otkucaje srca *ne* bi trebalo bilježiti kao smrtonosne. Nadalje, vidljivi otkucaji srca bez cirkulacije u trbušnoj aorti (*aorta abdominalis*) ne smatraju se smrtonosnima. Pri bilježenju ove krajnje točke embrije u kojih nisu vidljivi otkucaji srca trebalo bi promatrati pod povećanjem od najmanje 80 puta najmanje jednu minutu. Izostanak otkucaja srca bilježi se nakon 48, 72 i 96 sati.

33. Stope valjenja svih tretiranih i kontrolnih skupina trebalo bi bilježiti od 48 sati nadalje i uvrstiti u izvješća. Iako se valjenje ne primjenjuje kao krajnja točka za izračun LC_{50}, njime se osigurava izloženost embrija bez potencijalne zaštitne funkcije koriona, što može pomoći u tumačenju podataka.

34. Dodaci 3. i 5. sadržavaju detaljan opis normalnog (35.) i primjere abnormalnog razvoja embrija zebrica.

Analitička mjerenja

35. Na početku i na kraju ispitivanja mjere se pH, ukupna tvrdoća i vodljivost u kontroli/kontrolama i u najvišoj koncentraciji ispitivane kemikalije. U polustatičkim sustavima s obnavljanjem trebalo bi izmjeriti pH prije i nakon obnavljanja vode. Koncentracija otopljenog kisika mjeri se na kraju ispitivanja u negativnim kontrolama i u najvišoj ispitnoj koncentraciji s iskoristivim embrijima, gdje bi trebala biti u skladu s kriterijima valjanosti ispitivanja (vidjeti stavak 8. točku (f)). Ako postoji mogućnost da temperatura nije jednaka u svim pločama s 24 bunarića, ona se mjeri u tri nasumično odabrane posude. Temperaturu bi trebalo bilježiti po mogućnosti stalno za vrijeme ispitivanja, a barem jednom dnevno.

36. U statičkom sustavu koncentraciju ispitivane kemikalije trebalo bi mjeriti barem u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji, a po mogućnosti u svim tretiranim skupinama, na početku i na kraju ispitivanja. U polustatičkom ispitivanju (s obnavljanjem), ako se očekuje da će koncentracija ispitivane kemikalije ostati u granicama od ± 20 % nazivnih vrijednosti, preporučuje se da se barem najviša i najniža ispitna koncentracija analiziraju odmah nakon pripreme te neposredno prije obnavljanja. U ispitivanju u kojem se predviđa da koncentracija ispitivane kemikalije neće ostati u granicama od ± 20 % nazivne vrijednosti moraju se analizirati sve ispitne koncentracije odmah nakon pripreme te neposredno prije obnavljanja. U slučaju nedostatne količine za analizu može biti korisno spojiti ispitne otopine ili upotrijebiti zamjenske komore koje su izrađene od istog materijala te imaju isti omjer volumena i površine kao ploče s 24 bunarića. Preporučuje se da se rezultati svakako temelje na izmjerenim koncentracijama. Ako koncentracije ne ostanu unutar 80 – 120 % nazivne koncentracije, koncentracije koje imaju određeni učinak trebalo bi izraziti u odnosu na geometrijsku sredinu izmjerenih koncentracija; za više pojedinosti vidjeti 5. poglavlje Smjernica OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (28.).

ISPITIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE

37. Uz primjenu postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi može se provesti ispitivanje granične koncentracije pri koncentraciji od 100 mg/l ispitivane kemikalije ili pri granici topljivosti te kemikalije u ispitnom mediju (tj. pri nižoj od te dvije koncentracije) kako bi se dokazalo da je srednja smrtonosna koncentracija (LC_{50}) viša od te koncentracije. Ispitivanje granične koncentracije trebalo bi provesti s po 20 embrija u tretiranoj skupini, pozitivnoj

▼M7

kontroli i, prema potrebi, kontroli s otapalom, te 24 embrija u negativnoj kontroli. Ako je smrtnost pri ispitivanoj koncentraciji za 10 % veća od smrtnosti u negativnoj kontroli (ili kontroli s otapalom), trebalo bi provesti cjelovitu studiju. Treba zabilježiti sve zamijećene učinke. Ako je smrtnost u negativnoj kontroli (ili kontroli s otapalom) veća od 10 %, ispitivanje nije valjano i treba ga ponoviti.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

38. U ovom ispitivanju pojedinačni bunarići smatraju se neovisnim ponovljenim uzorcima za statističku analizu. Izrađuje se grafički prikaz postotka embrija za koje je nakon 48 i/ili 96 sati utvrđen pozitivan ishod najmanje jednog apikalnog zapažanja u odnosu na ispitne koncentracije. Za izračun nagiba krivulje, vrijednosti srednje smrtonosne koncentracije (LC_{50}) i granica pouzdanosti (95 %) trebalo bi primijeniti odgovarajuće statističke metode (38.) te proučiti Smjernice OECD-a o aktualnim pristupima u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti (39.).

Izvješće o ispitivanju

39. Izvješće o ispitivanju trebalo bi obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija:

tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi),

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

— opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

Ispitni organizmi:

— znanstveni naziv, soj, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje.

Ispitni uvjeti:

— ispitni postupak (npr. polustatičko ispitivanje s obnavljanjem),

— fotoperiod,

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora, vrste kontrole),

— obilježja kvalitete vode za držanje riba (npr. pH, tvrdoća, temperatura, vodljivost, otopljeni kisik),

— koncentracija otopljenog kisika, pH, ukupna tvrdoća, temperatura i vodljivost ispitnih otopina na početku i nakon 96 sati,

— način pripreme matičnih otopina i ispitnih otopina te učestalost obnavljanja,

▼M7

— obrazloženje za upotrebu otapala i obrazloženje za odabir otapala (ako nije voda),

— nazivne ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama; trebalo bi navesti i učinkovitost izdvajanja ispitivane tvari pri primjeni metode te granicu kvantifikacije (LoQ),

— dokaz da kontrole ispunjavaju opće kriterije valjanosti za preživljavanje,

— stopa oplodnje jajašaca,

— stopa valjenja u tretiranim i kontrolnim skupinama.

Rezultati:

— najviša koncentracija koja ne izaziva smrtnost u razdoblju ispitivanja,

— najniža koncentracija koja izaziva 100 %-tnu smrtnost u razdoblju ispitivanja,

— ukupna smrtnost u svakoj koncentraciji u svakom preporučenom vremenu promatranja,

— vrijednosti LC_{50} nakon 96 sati (i eventualno nakon 48 sati) za smrtnost s granicama pouzdanosti od 95 %, ako je to moguće,

— graf krivulje za odnos koncentracija i smrtnosti na kraju ispitivanja,

— smrtnost u kontrolama (negativne kontrole, kontrole unutar ploče, pozitivne kontrole i sve upotrijebljene kontrole s otapalom),

— podaci o ishodima svakog od četiri apikalna zapažanja,

— pojava i opis morfoloških i fizioloških anomalija, ako ih ima (vidjeti primjere navedene u Dodatku 5. slici 2.),

— svi događaji tijekom ispitivanja koji su možda utjecali na rezultate,

— statistička analiza i obrada podataka (probit analiza, logistički regresijski model i geometrijska sredina za LC_{50}),

— nagib i granice pouzdanosti regresije (transformirane) krivulje koncentracija-odgovor.

Sva odstupanja od ispitne metode i odgovarajuća objašnjenja.

Diskusija i tumačenje rezultata.

LITERATURA

1. OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

2. OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

3. Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

4. ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

5. Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

6. Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12-19.

7. Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktorski rad, Tehničko sveučilište u Dresdenu, Njemačka.

8. Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

9. Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

10. Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

11. Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

12. Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

13. Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

14. Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

15. Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

16. Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209.

17. Poglavlje C.4. ovog Priloga: Laka biorazgradivost.

18. Poglavlje C.29. ovog Priloga: Laka biorazgradivost – CO_2 u začepljenim posudama.

19. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

20. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

21. Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

22. Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

23. Poglavlje C.48. ovog Priloga: Kratkoročni reprodukcijski test na ribama. Vidjeti Dodatak 4.a.

24. Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

25. Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.

26. Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

27. ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Dostupno na: [http://www.iso.org].

28. OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

29. Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

30. Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

31. Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf.

32. Europska komisija (2007.): Preporuka Komisije 2007/526/EZ od 18. lipnja 2007. o smjernicama za smještaj životinja kojima se koristi za pokusne i druge znanstvene svrhe te skrb o njima (priopćena pod brojem dokumenta C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF].

33. Europska unija (2010.): Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Službeni list Europske unije*, L 276: 33. – 79.; 20.10.2010.

    http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF.

34. Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

35. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

36. Poglavlje C.2. ovog Priloga: Test akutne imobilizacije *Daphnia sp.*

37. Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978.

38. ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Dostupno na: [http://www.iso.org].

39. OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

40. Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detaljni pregled „Fish embryo toxicity assays”. Izvješće pod ugovorom br. 20385422 njemačke Savezne agencije za okoliš (UBA), Berlin, str. 298.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Apikalna krajnja točka: uzrokuje učinke na razini populacije.

Blastula: stanična formacija oko animalnog pola koja obuhvaća određeni dio žumanjka.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Epibolija: veliko umnožavanje pretežno epidermalnih stanica u fazi gastrulacije embrija i njihovo premještanje s dorzalne na ventralnu stranu, čime se entodermalni slojevi stanica uvlače u procesu sličnom invaginaciji i žumanjak se ugrađuje u embrij.

Protočno ispitivanje: test sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Kontrola unutar ploče: unutarnja kontrola koja se sastoji od 4 bunarića napunjena vodom za razrjeđivanje po ploči s 24 bunarića radi utvrđivanja moguće kontaminacije ploča koju prouzroči proizvođač ili istraživač tijekom postupka i svih učinaka na ploču koji mogu utjecati na rezultat ispitivanja (npr. promjena temperature).

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju

Voda za držanje: voda u kojoj se drže odrasle ribe.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC_{50}): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Polustatičko ispitivanje s obnavljanjem: ispitivanje s redovitim obnavljanjem ispitne otopine nakon određenih razdoblja (npr. svaka 24 sata).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

Somit: u embriju kralježnjaka koji se razvija somiti su nakupine mezoderma raspoređene na lateralnom dijelu neuralne cijevi iz kojih se s vremenom razvijaju dermis (dermatom), skeletni mišići (miotom) i kralješci (sklerotom).

Statičko ispitivanje: ispitivanje u kojem ispitne otopine ostaju nepromijenjene tijekom cijelog ispitivanja.

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

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

▼M7

Dodatak 2.

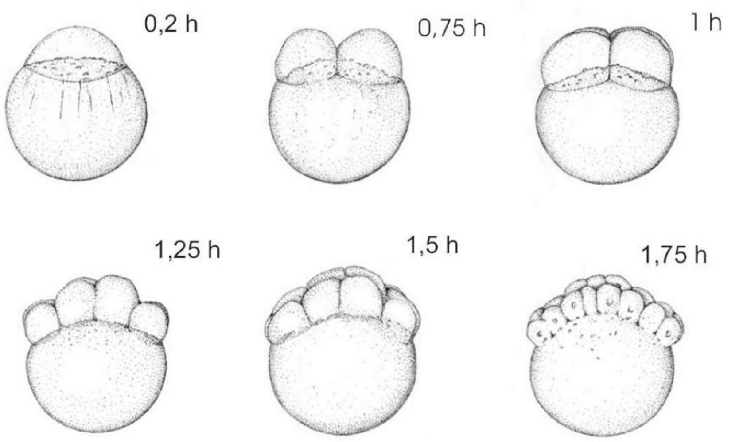
DRŽANJE, UZGOJ I TIPIČNI UVJETI ZA ISPITIVANJA AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIJIMA ZEBRICA

Zebrica (*Danio rerio*)		
Podrijetlo vrste		Indija, Burma, Melaka, Sumatra
Spolni dimorfizam		Ženke: izbočen trbuh kada nose jajašca Mužjaci: tanji, narančasta nijansa između plavih vodoravnih pruga (posebno očita na analnoj peraji)
Hranjenje		Suha hrana u listićima (najviše 3 % težine ribe po danu) 3 – 5 puta dnevno; usto ličinke (*nauplii*) račića *Artemia* i/ili male vodenbuhe odgovarajuće veličine dobivene iz nekontaminiranih izvora. Živom se hranom bogati okoliš i stoga bi kad god je to moguće trebalo davati živu hranu. Kako bi se osigurala optimalna kvaliteta vode, trebalo bi ukloniti višak hrane i izmet otprilike jedan sat nakon hranjenja.
Približna težina odraslih riba		Ženke: 0,65 ± 0,13 g Mužjaci: 0,5 ± 0,1 g
Držanje uzgojnih riba	Osvjetljenje	Fluorescentne žarulje (širokog spektra); 10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 lux, ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima); fotoperiod 12 – 16 sati
	Temperatura vode	26 ± 1 °C
	Kvaliteta vode	Zasićenost O_2 ≥ 80 %, tvrdoća: npr. ~30 – 300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ i NO_2^-: < 0,001 mg/l, rezidualni klor < 10 μg/l, ukupni organski klor < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Dodatni kriteriji za kvalitetu vode	Čestice < 20 mg/l, ukupni organski ugljik < 2 mg/l, ukupni organofosforni pesticidi < 50 ng/l, ukupni organoklorni pesticidi plus polikloririrani bifenili < 50 ng/l
	Veličina akvarija za držanje	Npr. 180 l, 1 riba/l
	Pročišćavanje vode	Stalno (filtriranje ugljenom); druge mogućnosti uključuju kombinacije s polustatičkim sustavom s obnavljanjem ili protočnim sustavom s neprekidnim obnavljanjem vode
	Preporučeni omjer mužjaka i ženki za razmnožavanje	2: 1 (ili masovno mriješćenje)
Akvariji za mriješćenje		Npr. akvariji od 4 l s dnom od čelične mreže i umjetnom biljkom kao podražajem za mriješćenje; vanjski grijači, ili masovno mriješćenje u akvarijima za držanje
Struktura i izgled jajašaca		Stabilan korion (tj. vrlo proziran, neljepljiv, promjera ~ 0,8 – 1,5 mm)
Stopa mriješćenja		Jedna zrela ženka mrijesti najmanje 50 – 80 jajašaca dnevno. Ovisno o soju, stopa mriješćenja može biti znatno viša. Stopa oplodnje trebala bi biti ≥ 70 %. Za ribe koje se prvi put mrijeste stopa oplodnje jajašaca može biti niža u prvih nekoliko mriješćenja.
Vrsta ispitivanja		Statičko, polustatičko s obnavljanjem, protočno, 26 ± 1 °C, ispitne komore kondicionirane 24 sata (npr. ploče s 24 bunarića po 2,5 – 5 ml)

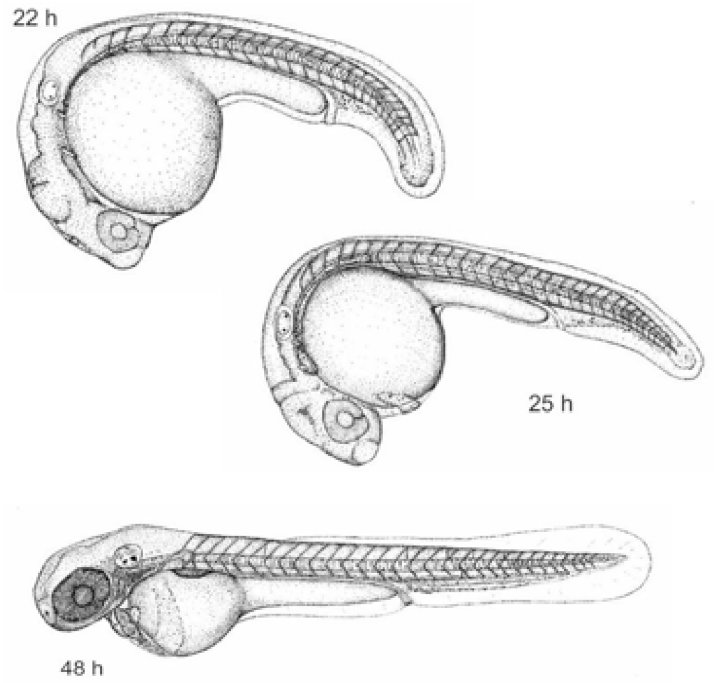
▼M7

Dodatak 3.

NORMALAN RAZVOJ ZEBRICE PRI TEMPERATURI OD 26 °C

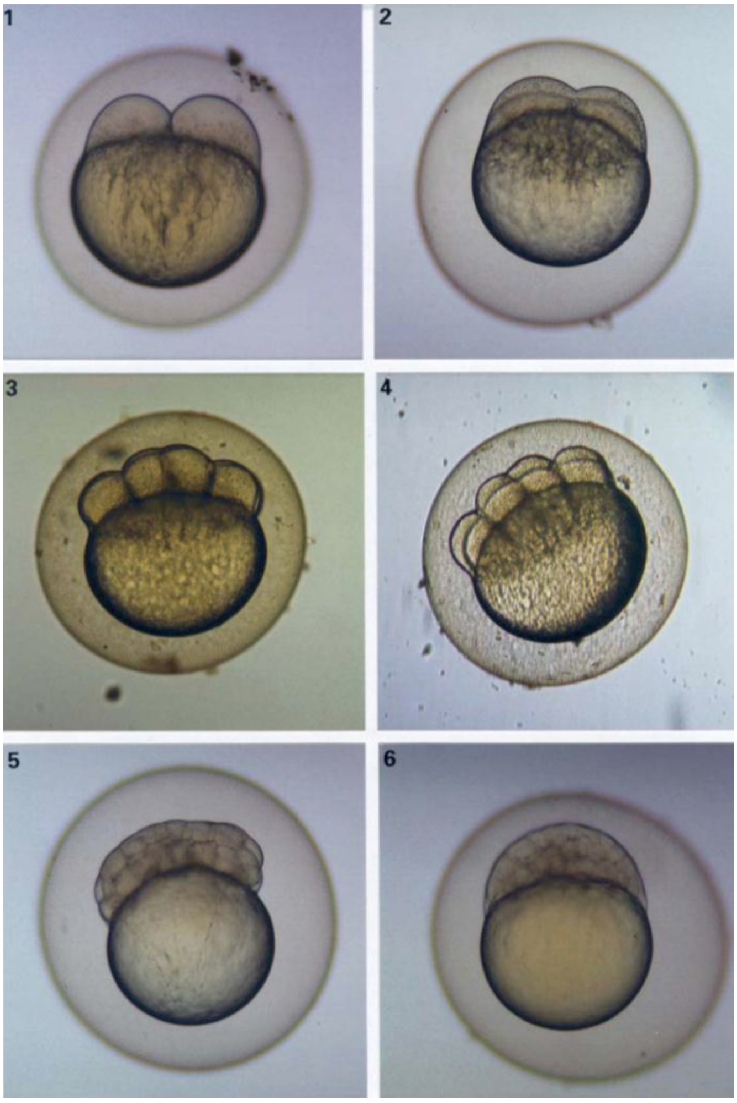


Slika 1. Odabrane faze ranog razvoja zebrice (*Danio rerio*): 0,2 – 1,75 sati nakon oplodnje (iz: Kimmel *et al*. 1995 (35.)). S pomoću vremenskog slijeda normalnog razvoja mogu se dijagnosticirati i oplodnja i iskoristivost jajašaca (vidjeti stavak 26.: Odabir oplođenih jajašaca).



Slika 2. Odabrane faze kasnog razvoja zebrice (*Danio rerio*) (embrij bez koriona radi bolje vidljivosti): 22 sata – 48 sati nakon oplodnje (iz: Kimmel *et al*. 1995 (35.)).

▼M7



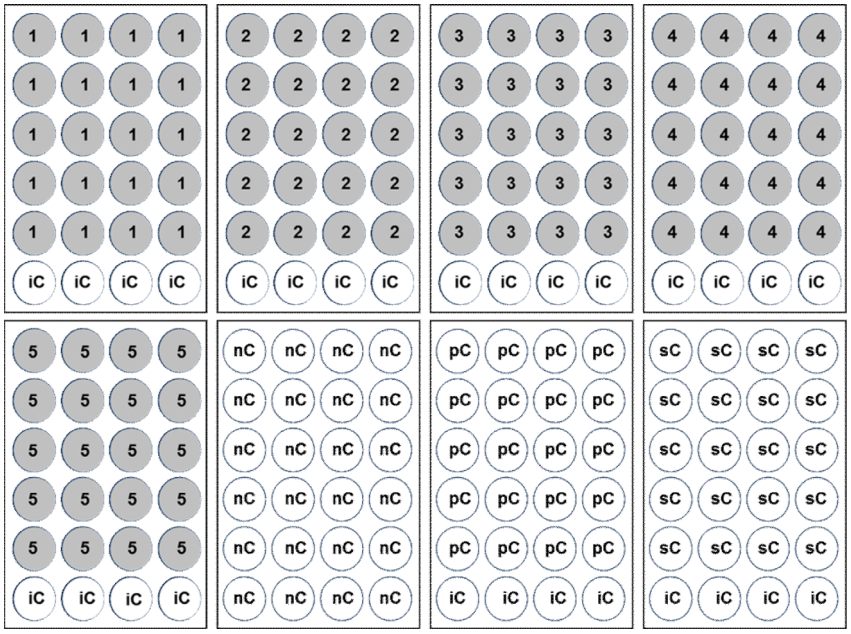
Slika 3. Normalan razvoj embrija zebrice (*Danio rerio*): (1) 0,75 sati, faza s 2 stanice; (2) 1 sat, faza s 4 stanice; (3) 1,2 sata, faza s 8 stanica; (4) 1,5 sati, faza s 16 stanica; (5) 4,7 sati, početak epibolije; (6) 5,3 sata, otprilike 50 % epibolije (iz: Braunbeck & Lammer 2006 (40.)).

▼M7

Dodatak 4.

Slika 1.

Nacrt ploča s 24 bunarića



1 – 5 = pet ispitnih koncentracija po kemikaliji;

nC = negativna kontrola (voda za razrjeđivanje);

iC = kontrola unutar ploče (voda za razrjeđivanje);

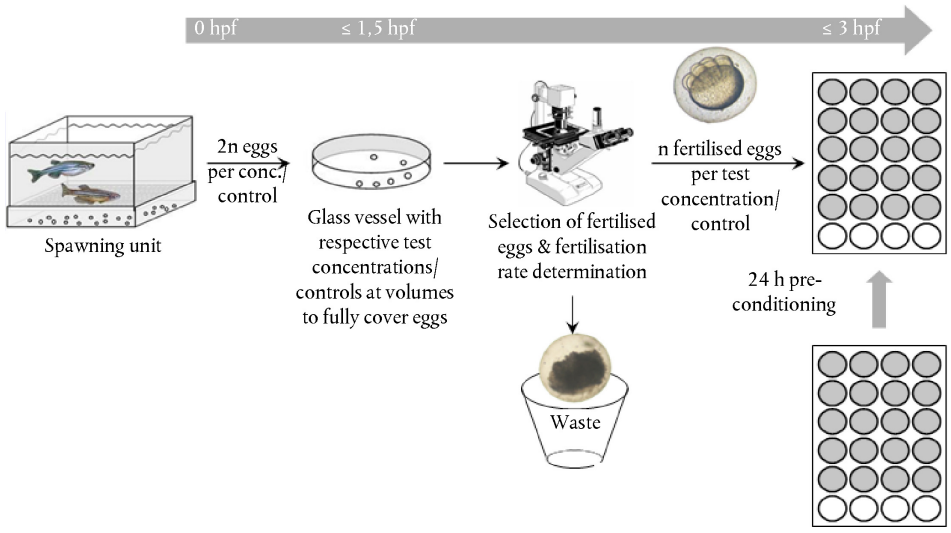
pC = pozitivna kontrola (3,4-dikloroanilin 4 mg/l);

sC = kontrola s otapalom

▼M7

Slika 2.

Nacrt postupka ispitivanja akutne toksičnosti na embrijima zebrica (slijeva nadesno): proizvodnja jajašaca, sakupljanje jajašaca, prethodno izlaganje u staklenim posudama odmah nakon oplodnje, odabir oplođenih jajašaca s pomoću invertnog mikroskopa i/ili binokularnog mikroskopa i raspodjela oplođenih jajašaca u pripremljene ploče s 24 bunarića s odgovarajućim ispitnim koncentracijama / kontrolama; n = broj jajašaca potrebnih po ispitnoj koncentraciji / kontroli (ovdje 20), hpf = sati nakon oplodnje.



▼M7

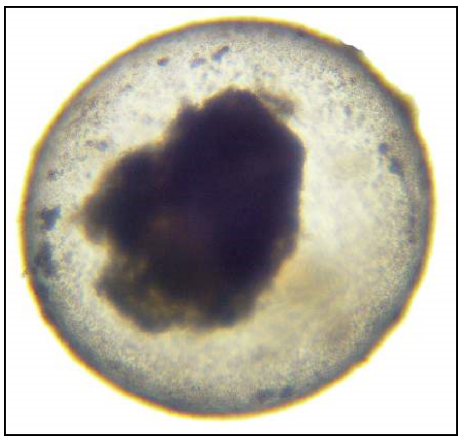
Dodatak 5.

PRIKAZ SMRTNIH KRAJNJIH TOČAKA ZA ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIJIMA ZEBRICA

Sljedeće apikalne krajnje točke znak su akutne toksičnosti te, posljedično, smrti embrija: *koagulacija embrija, neodvajanje repa, izostanak formiranja somita i izostanak otkucaja srca*. Sljedeće mikrofotografije odabrane su za ilustraciju tih krajnjih točaka.

Slika 1.

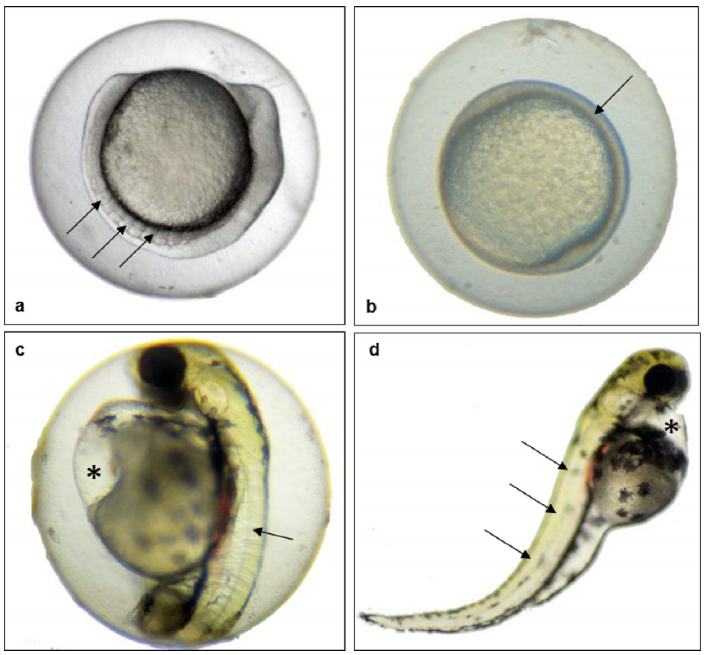
Koagulacija embrija



Pri promatranju uz jako osvjetljenje polja na koaguliranim embrijima zebrica vidljiv je niz neprozirnih nakupina.

Slika 2.

Izostanak formiranja somita

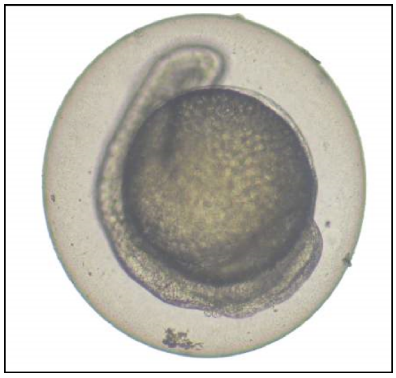


▼M7

Unatoč kašnjenju u razvoju za otprilike 10 sati, u embrija zebrice starog 24 sata na slici a) vide se dobro razvijeni somiti (→), dok u embrija na slici b) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). Unatoč velikom edemu žumanjčane vrećice (*), u embrija zebrice starog 48 sati na slici c) dobro se vide formirani somiti (→), dok u embrija zebrice starog 96 sati na slici d) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). U embrija na slici d) zamjetni su i zakrivljenost kralježnice (skolioza) i perikardijalni edem (*).

Slika 3.

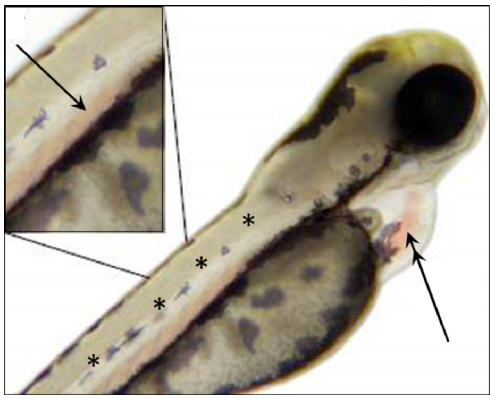
Neodvajanje korijena repa u bočnom prikazu



(a: →; embrij zebrice star 96 sati). Zamjetno je i da nema osnove oka (*).

Slika 4.

Izostanak otkucaja srca



Izostanak otkucaja srca po definiciji je teško pokazati na mikrofotografiji. Na izostanak otkucaja srca upućuje nekontrahirano srce (dvostruka strelica). Nepomičnost krvnih stanica u npr. trbušnoj aorti (→ u isječku) nije pokazatelj izostanka otkucaja srca. Zamjetan je i izostanak formiranja somita u ovog embrija (*, homogen umjesto segmentiranog izgleda mišićnog tkiva). Da bi se zabilježio izostanak otkucaja srca, embrije je potrebno promatrati najmanje jednu minutu pod povećanjem od najmanje 80 puta.

▼M7

C.50. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SUSTAVU BEZ SEDIMENTA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 238 (2014.). Namijenjena je za procjenu toksičnosti kemikalija za klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodnu vodenu dvosupnicu, vrstu iz porodice krocanja. Temelji se na postojećoj ASTM-ovoj ispitnoj metodi (1.) modificiranoj za ispitni sustav bez sedimenta (2.) radi procjene intrinzične ekotoksičnosti ispitivanih kemikalija (neovisno o raspodjeli ispitivane kemikalije u vodi i sedimentu). Ispitni sustav bez sedimenta analitički je manje složen (samo vodena faza) i rezultati se mogu analizirati paralelno i/ili u usporedbi s rezultatima dobivenima ispitivanjem na *Lemna sp.* (3.); usto, zbog potrebnih sterilnih uvjeta minimalizirani su učinci mikroorganizama i alga (apsorpcija / razgradnja kemikalije itd.). Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti za vodene organizme, već bi trebalo biti nadopuna tim ispitivanjima radi cjelovitije procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitna je metoda validirana međulaboratorijskim testom (4.).

2. Opisani su detalji ispitivanja s obnavljanjem (polustatičko) i bez obnavljanja (statičko) ispitne otopine. Ovisno o ciljevima ispitivanja i regulatornim zahtjevima, preporučuje se primjena polustatičke metode, npr. za tvari koje se brzo gube iz otopine zbog hlapljenja, adsorpcije, fotorazgradnje, hidrolize, taloženja ili biorazgradnje. Dodatne smjernice dostupne su u literaturi (5.). Ova ispitna metoda primjenjuje se za tvari za koje je ispitna metoda validirana (vidjeti pojedinosti u izvješću o međulaboratorijskom testu (4.)), formulacije ili poznate smjese; ako se ispituje smjesa, trebalo bi što detaljnije opisati kemijski identitet i količinu njezinih sastojaka. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu bez sedimenta nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sustavu voda-sediment (6.). Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smjese koje je namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO ISPITIVANJA

3. Kulturama klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*) koje stalno rastu (samo u modificiranom Andrewsovom mediju, vidjeti Dodatak 2.) omogućuje se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama ispitivane kemikalije u sustavu bez sedimenta 14 dana. Cilj je ispitivanja kvantificirati učinke kemikalije na vegetativni rast tijekom tog razdoblja ocjenjivanjem odabranih mjernih varijabli. Mjerne varijable su rast tj. povećanje duljine izdanka, bočnih grana i korijenja, povećanje svježe i suhe mase te povećanje broja pršljena. Usto, promatraju se i prepoznatljive kvalitativne promjene ispitnih organizama, kao što su izobličenje, kloroza, koja je prepoznatljiva po žutoj boji, i nekroza, prepoznatljiva po bijeloj ili smeđoj boji. Da bi se kvantificirali učinci kemikalije, rast u ispitnim otopinama uspoređuje se s rastom u kontrolama te se utvrđuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak (x %) inhibicije rasta i izražava se kao EC_x; „x” može biti bilo koja vrijednost, ovisno o regulatornim zahtjevima, npr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba napomenuti da su procjene EC_{10} i EC_{20} pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od razine učinka koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu EC_{20} koeficijent varijacije trebao bi biti < 20 %.

4. Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na temelju procjena duljine glavnog izdanka i triju drugih mjernih varijabli) i prirast (na temelju povećanja duljine glavnog izdanka i triju drugih mjernih varijabli) netretiranih i tretiranih biljaka. Na temelju specifične brzine rasta (r) i prirasta (y)

▼M7

zatim se određuju E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) odnosno E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Usto se mogu statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC).

PODACI O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

6. Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju ispitivane kemikalije u ispitnom mediju. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati podatke o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturna formula, čistoća i nečistoće, topljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline (pK_a), koeficijent razdjeljenja oktanol/voda (K_{ow}), tlak pare i biorazgradivost. Topljivost u vodi i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u razdoblju ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane kemikalije. Tako se može zaključiti treba li poduzeti određene mjere za kontrolu tih gubitaka. Ako podaci o topljivosti i stabilnosti ispitivane kemikalije nisu pouzdani, preporučuje se da se topljivost i stabilnost procijene u uvjetima ispitivanja, tj. u uzgojnom mediju te pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tijekom ispitivanja.

7. Kontrola pH-vrijednosti ispitnog medija posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili tvari koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje kemikalija čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a (5.).

VALJANOST ISPITIVANJA

8. Da bi ispitivanje bilo valjano, vrijeme udvostručenja duljine glavnog izdanka u kontroli mora biti kraće od 14 dana. Taj se kriterij može ispuniti primjenom statičkog ili polustatičkog ispitivanja uz medije i ispitne uvjete opisane u ovoj metodi.

9. Srednji koeficijent varijacije za prirast na temelju mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) i dodatnih mjernih varijabli (vidjeti stavak 37.) u kontrolnim kulturama ne prelazi 35 % između ponovljenih uzoraka.

10. Više od 50 % ponovljenih uzoraka kontrolne skupine održavaju se sterilnima, tj. bez vidljivih onečišćenja drugim organizmima kao što su alge, gljivice i bakterije (bistra otopina), tijekom razdoblja izlaganja od 14 dana. *Napomena:* smjernice o tome kako procijeniti sterilnost dostupne su u izvješću o međulaboratorijskom testu (4.).

REFERENTNA KEMIKALIJA

11. Referentna kemikalija (ili više njih), kao što je 3,5-diklorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu (4.), može se ispitati radi provjere ispitnog postupka; prema podacima iz međulaboratorijskog testa srednje su vrijednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različite varijable odgovora (vidjeti stavke 37. – 41. ove ispitne metode) između 3,2 mg/l i 6,9 mg/l (za pojedinosti o intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvješće o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna kemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s određivanjem toksičnosti ispitivane kemikalije.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

12. Sva oprema koja dolazi u dodir s ispitnim medijima trebala bi biti izrađena od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Staklenu opremu koja se upotrebljava za uzgoj i ispitivanje trebalo bi očistiti od kemijskih onečišćivača koji bi mogli dospjeti u ispitni medij i trebala bi biti sterilna. Ispitne posude trebale bi biti dovoljno duge da izdanci u kontrolnim posudama mogu rasti u vodenoj fazi, a da ne dosegnu površinu ispitnog medija na kraju ispitivanja. Preporučuju se staklene epruvete s debelim stijenkama od borosilikatnog stakla, bez izljeva na vrhu, unutarnjeg promjera približno 20 mm, duljine približno 250 mm, s aluminijskim čepovima.

13. Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast gljivica i bakterija), ispitne otopine moraju se pripremati u sterilnim uvjetima. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

14. Kulture i ispitne posude ne smiju se držati zajedno. To je najlakše postići ako se upotrebljavaju odvojene uzgojne komore, inkubatori ili prostorije. Trebalo bi se moći kontrolirati osvjetljenje i temperaturu te ih održavati na stalnoj razini.

Ispitni organizam

15. Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodna vodena dvosupnica, vrsta je iz porodice krocanja. Između lipnja i kolovoza njezini sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u tlo sustavom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, no neonečišćenim vodama stajaćicama bogatijima kalcijem i s muljevitim supstratom. Klasasti krocanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.

16. Za ispitivanje toksičnosti u sustavu bez sedimenta potrebne su sterilne biljke. Ako laboratorij koji provodi ispitivanje nema potrebne kulture klasastog krocnja, može preuzeti sterilni biljni materijal iz drugog laboratorija ili prikupiti (nesterilni) biljni materijal u prirodi odnosno nabaviti ga od komercijalnog dobavljača; za biljke prikupljene u prirodi potrebna je taksonomska provjera vrste. Ako se biljke prikupljaju u prirodi ili nabavljaju od komercijalnog dobavljača, potrebno ih je sterilizirati (1.) te držati u kulturi u istom mediju kakav će se upotrebljavati u ispitivanju najmanje osam tjedana prije upotrebe. Na mjestima na kojima se prikupljaju polazne kulture ne smije biti očitih izvora onečišćenja. Pri prikupljanju klasastog krocnja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizirati s drugim vrstama krocnja. Ako se kulture nabavljaju iz drugog laboratorija, treba ih držati u sličnim uvjetima najmanje tri tjedna. Uvijek treba navesti podrijetlo biljnog materijala i vrstu koja se upotrebljava za ispitivanje.

17. Biljke koje će se upotrijebiti za ispitivanje trebalo bi pažljivo odabrati jer će njihova kvaliteta i jednolikost znatno utjecati na rezultate ispitivanja. Trebalo bi upotrebljavati mlade biljke koje brzo rastu i nemaju vidljivih oštećenja ni promjena boje (kloroza). Pojedinosti o pripremi ispitnih organizama navedene su u Dodatku 4.

Uzgoj kulture

18. Kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad određeno vrijeme nisu planirana ispitivanja s krocnjem), kulture se mogu držati pod smanjenim osvjetljenjem i na nižoj temperaturi (50 μE m^{2} s^{1}, 20 ± 2 °C). Pojedinosti o uzgoju navedene su u Dodatku 3.

▼M7

19. Najmanje 14 dana – 21 dan prije ispitivanja dovoljan broj ispitnih organizama aseptički se prenosi u svježi sterilni medij i uzgaja 14 dana – 21 dan u ispitnim uvjetima kao pretkultura. Pojedinosti za pripremu pretkulture navedene su u Dodatku 4.

Ispitni medij

20. Za klasati krocanj u ispitnom sustavu bez sedimenta preporučuje se samo jedan hranjivi medij, kako je opisano u Dodatku 2. Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se modifikacija Andrewsova medija kako je opisano u (1.). Modificirani Andrewsov medij pripravlja se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina s dodatkom 3 % saharoze. Pojedinosti o pripremi medija navedene su u Dodatku 2.

21. Za dobivanje ispitnih otopina potreban je deseterostruko koncentrirani modificirani Andrewsov medij (uz razrjeđivanje prema potrebi). Sastav medija naveden je u Dodatku 2.

Ispitne otopine

22. Ispitne se otopine obično pripremaju razrjeđivanjem matične otopine. Matične otopine ispitivane kemikalije obično se pripremaju otapanjem kemikalije u demineraliziranoj (tj. destiliranoj ili deioniziranoj) vodi. Hranjive tvari dodaju se iz deseterostruko koncentriranoga modificiranog Andrewsova medija.

23. Matične otopine ispitivane kemikalije mogu biti sterilizirane u autoklavu na 121 °C 20 minuta ili sterilnom filtracijom, ako tehnika sterilizacije ne denaturira ispitivanu kemikaliju. Ispitne otopine mogu biti pripremljene i u sterilnoj demineraliziranoj vodi ili mediju, u sterilnim uvjetima. Pri odabiru postupka sterilizacije matičnih otopina ispitivane kemikalije trebalo bi uzeti u obzir termostabilnost i adsorpciju na različitim površinama. Zbog toga se preporučuje da se matične otopine pripremaju u sterilnim uvjetima, tj. koristeći se sterilnim materijalom za otapanje ispitivane kemikalije u sterilnim uvjetima (npr. sterilizacija plamenom, sterilizacija u komorama sa laminarnim protokom itd.) u sterilnoj vodi. Ova tehnika pripreme sterilnih matičnih otopina valjana je i za tvari i za smjese.

24. Najviša ispitna koncentracija ispitivane kemikalije u pravilu ne bi smjela biti viša od topljivosti te kemikalije u vodi u ispitnim uvjetima. Za ispitivane kemikalije slabe topljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu otopinu ili disperziju kemikalije s pomoću organskog otapala ili dispergenta kako bi se olakšalo dodavanje točnih količina ispitivane kemikalije u ispitni medij te ubrzalo njezinu disperziju i otapanje. Treba svakako nastojati izbjeći upotrebu takvih materijala. Pomoćna otapala ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od otapala u širokoj uporabi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru ($\leq$ 100 µl/l), te voditi računa da sve tretirane i kontrolne skupine sadržavaju istu koncentraciju otapala odnosno dispergenta. Dodatne smjernice o upotrebi dispergenata dostupne su u literaturi (5.).

Ispitne i kontrolne skupine

25. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane kemikalije za klasasti krocanj na temelju ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru prikladnih ispitnih koncentracija. U glavnom ispitivanju toksičnosti u pravilu je potrebno pet (kao u testu inhibicije rasta *Lemna sp.*, poglavlje C.26. ovog Priloga) do sedam ispitnih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu; treba ih odabrati tako da vrijednosti NOEC i EC_{50} budu unutar raspona koncentracija

▼M7

(vidjeti u nastavku). Ispitne se koncentracije po mogućnosti ne bi smjele razlikovati za faktor veći od 3,2; no vrijednost može biti i veća ako je krivulja koncentracija-odgovor ravna. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Potrebno je najmanje pet ponovljenih uzoraka za svaku ispitnu koncentraciju.

26. Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija (za ispitivanje za utvrđivanje raspona i/ili glavno ispitivanje toksičnosti) trebalo bi uzeti u obzir sljedeće:

da bi se pri određivanju EC_x osigurala primjerena razina pouzdanosti, vrijednost EC_x mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Primjerice, ako se procjenjuje EC_{50}, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od EC_{50}. Ako je vrijednost EC_{50} izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno procijeniti statističku prikladnost modela.

Ako je cilj procijeniti LOEC/NOEC, najniža ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno niska da rast ne bude znatno manji od rasta u kontroli. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno manji nego u kontroli. U protivnom je ispitivanje potrebno ponoviti s drugim rasponom koncentracija (osim ako je najviša koncentracija na granici topljivosti ili jednaka maksimalnoj predviđenoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg/l).

27. Svako ispitivanje trebalo bi uključivati kontrole u kojima su hranjivi medij, ispitni organizam (odabir što je više moguće homogenog biljnog materijala, svježe bočne grane iz pretkultura skraćene na 2,5 cm od baze), okolni uvjeti i postupci isti kao u ispitnim posudama, ali bez ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljava pomoćno otapalo ili dispergent, potrebna je dodatna kontrola koja sadržava istu koncentraciju otapala/dispergenta kao i posude s ispitivanom kemikalijom. Potrebno je barem 10 kontrolnih posuda kao ponovljenih uzoraka (i posuda s otapalom, ako se ono upotrebljava).

28. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji. No svakako je potrebno barem 10 kontrolnih ponovljenih uzoraka.

Izlaganje

29. Svježe bočne grane iz pretkulture skraćene na 2,5 cm od baze nasumično se raspoređuju po ispitnim posudama u aseptičkim uvjetima; svaka ispitna posuda trebala bi sadržavati po jednu bočnu granu dugu 2,5 cm s apikalnim meristemom na jednom kraju. Odabrani biljni materijal u svim posudama trebao bi biti jednake kvalitete.

30. Ispitne posude treba nasumično rasporediti po inkubatoru kako bi se minimizirao utjecaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi. Usto ih je potrebno pri promatranju rasporediti zajedno u blokove ili nasumično premještati posude (ili ih češće premještati).

31. Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti pokaže da se koncentracija ispitivane kemikalije ne može održati (tj. izmjerena koncentracija pada ispod 80 % od izmjerene početne koncentracije) tijekom razdoblja ispitivanja (14 dana), preporučuje se polustatičko ispitivanje. U tom slučaju biljke bi trebalo izložiti svježe pripremljenim ispitnim i kontrolnim otopinama najmanje jednom

▼M7

tijekom ispitivanja (npr. 7. dan). Učestalost izlaganja svježem mediju ovisit će o stabilnosti ispitivane kemikalije; za vrlo nestabilne ili hlapljive kemikalije možda će biti potrebno češće izlaganje da bi se održale približno stalne koncentracije.

32. Ova ispitna metoda ne obuhvaća izlaganje folijarnom primjenom (raspršivanje po lišću).

Ispitni uvjeti

33. Za rasvjetu bi se trebalo koristiti toplim i/ili hladnim bijelim fluorescentnim svjetlom od 100 – 150 μE $m.^{2}$ s^{1} izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na točkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i dno ispitnih posuda (jednako osvjetljenju od 6 000 – 9 000 lux) te u ciklusu svjetlost-tama od 16: 8 h. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjecat će na izmjerenu vrijednost. Sferičnim senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim" senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetočkasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.

34. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 23 ± 2 °C. Posebnu pozornost treba obratiti na pomak pH-vrijednosti u nekim slučajevima, npr. kad se ispituju nestabilne kemikalije ili metali; pH-vrijednost trebala bi ostati u rasponu 6 – 9. Za dodatne smjernice vidjeti (5.).

Trajanje

35. Ispitivanje završava 14 dana nakon prenošenja biljaka u ispitne posude.

Mjerenja i analitička određivanja

36. Na početku ispitivanja duljina glavnog izdanka ispitnog organizma je 2,5 cm (vidjeti stavak 29.); mjeri se pomičnim mjerilom (vidjeti Dodatak 4.) ili fotografiranjem i analizom slike. Duljinu glavnog izdanka ispitnog organizma koji izgleda normalno ili neuobičajeno treba odrediti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tijekom 14-dnevnog razdoblja izlaganja i na kraju ispitivanja. Napomena: kao alternativa za one kojima nije dostupna analiza slika, ako je radna površina sterilizirana prije stavljanja biljaka u ispitne posude, duljina glavnog izdanka može se izmjeriti i sterilnim pomičnim mjerilom na početku i tijekom ispitivanja. Treba zabilježiti sve promjene u razvoju biljaka npr. deformaciju izdanka, izgled, naznake nekroze, klorozu, raspadanje ili gubitak sposobnosti plutanja te promjene duljine i izgleda korijenja. Treba zabilježiti i bitne značajke ispitnog medija (npr. prisutnost neotopljenog materijala, rast algi, gljivica ili bakterija u ispitnoj posudi).

37. Uz određivanja duljine glavnog izdanka tijekom ispitivanja, trebalo bi procijeniti i učinke ispitivane kemikalije na tri sljedeće mjerne varijable (ili više njih):

i. ukupna duljina bočnih grana;

ii. ukupna duljina izdanka;

iii. ukupna duljina korijena;

iv. svježa masa;

v. suha masa;

vi. broj pršljena.

▼M7

Napomena 1.: opažanja tijekom ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru odgovarajućih dodatnih mjerenja šest navedenih varijabli.

Napomena 2.: svakako je poželjno odrediti svježu i suhu masu (parametri iv. i v.).

Napomena 3.: zbog činjenice da saharoza i svjetlost (izloženost korijenja svjetlosti tijekom ispitivanja) mogu utjecati na nositelje auksina (biljni hormon rasta) i da neke kemikalije mogu imati način djelovanja sličan djelovanju auksina, upitno je treba li uključiti krajnju točku koja se odnosi na korijen (parametar iii.).

Napomena 4.: rezultati međulaboratorijskog ispitivanja pokazuju velike koeficijente varijacije (> 60 %) za ukupnu duljinu bočnih grana (parametar i.). Ukupna duljina bočnih grana u svakom je slučaju uključena u mjeru ukupne duljine izdanka (parametar ii.) koja pokazuje prihvatljivije koeficijente varijacije od < 30 %.

Napomena 5.: s obzirom na navedeno, glavne krajnje točke koje je preporučljivo mjeriti su: ukupna duljina izdanka, svježa masa i suha masa (parametri ii., iv. i v.); mjerenje parametra vi. (broj pršljena) ovisi o izboru izvođača pokusa.

38. Prednost je duljine glavnog izdanka i broja pršljena u tome što ih se može odrediti za svaku ispitnu i kontrolnu posudu na početku, za vrijeme i na kraju ispitivanja fotografiranjem i analizom slike, iako se može upotrijebiti i (sterilno) pomično mjerilo.

39. Ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina korijena (kao zbroj svih bočnih grana ili korijena) te ukupna duljina izdanka (kao zbroj duljine glavnog izdanka i ukupne duljine bočnih grana) mogu se mjeriti pomičnim mjerilom na kraju izlaganja.

40. Svježu i/ili suhu masu trebalo bi odrediti na početku ispitivanja na uzorku pretkulture reprezentativnom za biljni materijal koji se upotrebljava na početku ispitivanja te na kraju ispitivanja na biljnom materijalu iz svake ispitne i kontrolne posude.

41. Ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena mogu se odrediti kako slijedi:

i. ukupna duljina bočnih grana: duljina bočnih grana može se odrediti mjerenjem svih bočnih grana pomičnim mjerilom na kraju izlaganja. Ukupna duljina bočnih grana zbroj je duljina svih bočnih grana u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;

ii. ukupna duljina izdanka: duljina glavnog izdanka može se odrediti analizom slike ili pomičnim mjerilom. Ukupna duljina izdanka zbroj je ukupne duljine bočnih grana i duljine glavnog izdanka u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi na kraju izlaganja;

iii. ukupna duljina korijena: ukupna duljina korijena može se odrediti mjerenjem svih korijena pomičnim mjerilom na kraju izlaganja. Ukupna duljina korijena zbroj je duljina svih korijena u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;

iv. svježa masa: svježa masa može se odrediti vaganjem ispitnih organizama na kraju izlaganja. Sav biljni materijal iz svake ispitne i kontrolne posude ispire se destiliranom vodom i lagano suši celuloznim papirom. Nakon te

▼M7

pripreme svježa masa određuje se vaganjem. Početna biomasa (svježa masa) određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda;

v. suha masa: nakon pripreme za određivanje svježe mase, ispitni organizmi suše se na 60 °C dok ne dosegnu konstantnu masu. Ta je masa suha masa. Početna biomasa (suha masa) određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda;

vi. broj pršljena: broje se svi pršljeni na glavnom izdanku.

Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

42. Ako se primjenjuje statičko ispitivanje, trebalo bi na početku i kraju ispitivanja odrediti pH svake tretirane skupine. Ako se primjenjuje polustatičko ispitivanje, pH bi trebalo izmjeriti u svakoj šarži „svježe" ispitne otopine prije svakog obnavljanja te u odgovarajućim „potrošenim" otopinama.

43. Intenzitet svjetlosti trebalo bi mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji, na točkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i ispitni organizmi. Mjerenja bi trebalo provesti najmanje jedanput tijekom ispitivanja. Usto najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, s pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti temperaturu medija u zamjenskoj posudi koja se drži u istim uvjetima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

44. Koncentracije ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) određuju se u prikladnim razmacima tijekom ispitivanja. U statičkom ispitivanju koncentracije se moraju odrediti barem na početku i na kraju ispitivanja.

45. U polustatičkom ispitivanju u kojemu se očekuje da koncentracija ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) neće ostati u granicama od ± 20 % nazivne koncentracije potrebno je analizirati sve svježe pripremljene ispitne otopine i ponoviti analizu pri svakom obnavljanju otopine. Međutim, u svim ispitivanjima u kojima izmjerene početne koncentracije ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) nisu u granicama od ± 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar područja od 80 – 120 % početne koncentracije), kemijska se određivanja mogu provoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje ispitnih koncentracija prije obnavljanja potrebno je provesti samo na po jednoj posudi za svaku ispitnu koncentraciju (ili na združenom sadržaju posuda iste koncentracije).

46. Ako se može dokazati da se ispitna koncentracija tijekom cijelog ispitivanja na zadovoljavajući način održavala u granicama od ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako je odstupanje od nazivne ili izmjerene početne koncentracije veće od ± 20 %, analiza rezultata treba se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili na modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane kemikalije (5.).

Ispitivanje granične koncentracije

47. U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana kemikalija ne djeluje toksično u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje topljivosti u ispitnom mediju, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se provesti ispitivanje granične koncentracije koje uključuje usporedbu odgovora kontrolne skupine s odgovorom jedne tretirane skupine (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara

▼M7

granici topljivosti). Preporučuje se da se uz ispitivanje granične koncentracije svakako provede i analiza koncentracije za izlaganje. Svi navedeni ispitni uvjeti i kriteriji valjanosti vrijede i za ispitivanje granične koncentracije, s time da broj tretiranih ponovljenih uzoraka treba udvostručiti. Rast u kontrolnoj i tretiranoj skupini može se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Varijable odgovora

48. Svrha je ispitivanja odrediti učinke ispitivane kemikalije na vegetativni rast klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*). U ovoj ispitnoj metodi opisane su dvije varijable odgovora:

a) prosječna specifična brzina rasta: ta se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena logaritama duljine glavnog izdanka, i usto na temelju promjena logaritama drugih mjernih parametara – ukupne duljine izdanka, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena – tijekom vremena (izraženo po danu) u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Napomena: za mjerne parametre ukupnu duljinu bočnih grana i ukupnu duljinu korijena ne može se izračunati prosječna specifična brzina rasta. Na početku ispitivanja ispitni organizam nema bočne grane ni korijenje (nakon pripreme iz pretkulture); nakon početne vrijednosti nula, izračun prosječne specifične brzine rasta nije definiran;

b) prirast: ta se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena duljine glavnog izdanka, i usto na temelju promjena drugih mjernih parametara – najbolje ukupne duljine izdanka, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, te drugih parametara ako se smatraju korisnima, u kontrolama i svim tretiranim skupinama do kraja ispitivanja.

49. Procjene toksičnosti trebale bi se temeljiti na duljini glavnog izdanka i trima dodatnim mjernim varijablama (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena, vidjeti stavak 37. i napomene 2., 4. i 5. uz taj stavak) jer neke kemikalije mogu utjecati na druge mjerne varijable znatno više nego na duljinu glavnog izdanka. Taj bi utjecaj ostao neotkriven kad bi se računala samo duljina glavnog izdanka.

Prosječna specifična brzina rasta

50. Prosječna specifična brzina rasta za određeno razdoblje izračunava se kao logaritamsko povećanje varijabli rasta – duljine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabli (ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena) – primjenom formule u nastavku za svaki ponovljeni uzorak kontrolne i tretirane skupine:

$$\mu_{i-j} = \frac{\left(\ln(N_j) - \ln(N_i\right)}{t}$$

pri čemu je:

μ_{i-j}: prosječna specifična brzina rasta od vremena i do j

N_i: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i

N_j: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j

t: vremensko razdoblje od i do j

▼M7

Za svaku tretiranu i kontrolnu skupinu treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta i procjene varijance.

51. Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo razdoblje ispitivanja (vrijeme „i" u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j" kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance. Usto je potrebno procijeniti i brzinu rasta u pojedinim etapama tijekom razdoblja izlaganja kako bi se ocijenili učinci ispitivane kemikalije koji se javljaju (npr. pregledom logaritamski transformiranih krivulja rasta).

52. Postotak inhibicije brzine rasta (I_r) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu skupinu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:

% Ir: postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta

μC: srednja vrijednost μ u kontroli

μT: srednja vrijednost μ u tretiranoj skupini

Prirast

53. Učinci na prirast određuju se na temelju mjerne varijable duljine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabli (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena) u svakoj ispitnoj posudi na početku i na kraju ispitivanja. Za svježu ili suhu masu početna biomasa određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda. Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prirasta i procjene varijance. Srednji postotak inhibicije prirasta (% I_y) za svaku tretiranu skupinu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

pri čemu je:

% Iy: postotak smanjenja prirasta

bC: konačna biomasa u kontrolnoj skupini umanjena za početnu biomasu

bT: konačna biomasa u tretiranoj skupini umanjena za početnu biomasu

Vrijeme udvostručenja

54. Da bi se odredilo vrijeme udvostručenja (T_d) duljine glavnog izdanka i utvrdilo je li ispunjen taj kriterij valjanosti (vidjeti stavak 8.), dobivene podatke za kontrolne posude treba uvrstiti u sljedeću formulu:

$T_d = \ln 2/\mu$

pri čemu je prosječna specifična brzina rasta određena kako je opisano u stavcima 50. – 52.

▼M7

Prikaz krivulja koncentracija-odgovor

55. Treba izraditi krivulje koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y, izračunanih kako je navedeno u stavku 53.) i logaritma koncentracije ispitivane kemikalije.

Procjena EC_x

56. Procjene EC_x trebale bi se temeljiti i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta (E_rC_x) i na prirastu (E_yC_x), a svaka od njih bi se pak trebala temeljiti na duljini glavnog izdanka te eventualno drugim mjernim varijablama (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena). Razlog tomu je što neke kemikalije ne utječu jednako na duljinu glavnog izdanka i na druge mjerne varijable. Potrebni parametri toksičnosti stoga su četiri vrijednosti EC_x za svaku izračunanu razinu inhibicije x: E_rC_x (duljina glavnog izdanka), E_rC_x (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena), E_yC_x (duljina glavnog izdanka) i E_yC_x (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena).

57. Treba napomenuti da vrijednosti EC_x izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultatima ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uvjeta ove ispitne metode, vrijednosti EC_x na temelju prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) u većini će slučajeva biti više od rezultata na temelju prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti tih dviju varijabli odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

Statistički postupci

58. Cilj je dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor regresijskom analizom. Ako se provede linearizacijska transformacija podataka odgovora, npr. s pomoću probit, logit ili Weibullova modela (7.), može se primijeniti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno povećati te tako otežati analizu (7.). Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) te se moraju posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi (8., 9. i 10.).

59. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti EC_x na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Po mogućnosti, za sve procjene treba odrediti granice pouzdanosti od 95 %. Valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu trebalo bi provesti na temelju odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na temelju srednjih vrijednosti tretiranih skupina.

60. Ako raspoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem (*bootstrapping*) (10.).

61. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je usporediti srednje vrijednosti tretiranih skupina primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajuće metode višestruke usporedbe ili testa trenda. Može biti koristan Dunnettov ili Williamsov test (12., 13., 14., 15., 16.). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka homogenosti varijanci ANOVA-e. To se može procijeniti grafički ili formalnim testom (15.). Prikladni su Leveneov ili Bartlettov test. Ako pretpostavka homogenosti

▼M7

varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonckheereovi „step-down" testovi trenda. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (10.).

62. Novije znanstvene spoznaje rezultirale su preporukom da se pojam NOEC-a napusti i zamijeni procjenama EC_x dobivenima regresijom. Za ovo ispitivanje s klasastim krocnjem nije utvrđena primjerena vrijednost x. Ipak, čini se da je primjeren raspon od 10 do 20 % (ovisno o odabranoj varijabli odgovora), a poželjno je da se navedu obje vrijednosti, EC_{10} i EC_{20}, te njihove granice pouzdanosti.

Izvješćivanje

63. Izvješće o ispitivanju treba obuhvaćati sljedeće:

Ispitivana kemikalija

tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi),

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

— opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

Ispitne vrste

— znanstveni naziv i podrijetlo.

Ispitni uvjeti

— ispitni postupak (statički ili polustatički),

— datum početka i trajanje ispitivanja,

— ispitni medij,

— opis plana ispitivanja: ispitne posude i pokrovi, količine otopina, duljina glavnog izdanka po ispitnoj posudi na početku ispitivanja,

— ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,

— način pripreme matičnih i ispitnih otopina, uključujući eventualnu upotrebu otapala ili dispergenata,

— temperatura tijekom ispitivanja,

— izvor svjetlosti, intenzitet i homogenost svjetlosti,

— pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medija,

— metoda analize ispitivane kemikalije s odgovarajućim podacima za procjenu kvalitete (validacijske studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

▼M7

— metode određivanja duljine glavnog izdanka i drugih mjernih varijabli, npr. ukupne duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijena, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena,

— stanje kulture (sterilna ili nesterilna) u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju,

— sva odstupanja od ove ispitne metode.

Rezultati

— neobrađeni podaci: duljina glavnog izdanka i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju i svakoj analizi,

— srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,

— krivulje rasta za svaku mjernu varijablu,

— izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,

— grafički prikaz odnosa koncentracija-učinak,

— procjene krajnjih točaka toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, i pripadajući intervali pouzdanosti; ako se izračunavaju LOEC i NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,

— ako se primjenjuje ANOVA, jačina učinka koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj skupini,

— svi vidljivi znakovi fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim otopinama,

— rasprava o rezultatima, uključujući i sve utjecaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

1. ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

2. Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, str. 702-710.

3. Poglavlje C.26. ovog Priloga*: Test inhibicije rasta Lemna sp.*

4. OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

5. OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

6. Poglavlje C.51. ovog Priloga: Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment.

▼**M7**

7. Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

8. Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, str. 157-167.

9. Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, str. 1485-1494.

10. OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

11. Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

12. Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, str. 1096-1121.

13. Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, str. 482-491.

14. Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, str. 103-117.

15. Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, str. 519-531.

16. Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, str. 93-96.

▼M7

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Biomasa je svježa i/ili suha masa žive tvari u populaciji. U ovom ispitivanju biomasa je zbroj glavnog izdanka, svih bočnih grana i svog korijenja.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Kloroza je promjena zelene boje ispitnog organizma, posebno pršljena, u žućkastu.

ECx je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja uzrokuje smanjenje rasta klasastog krocnja od x % (npr. 50 %) u određenom razdoblju izlaganja (koje treba posebno navesti ako nije jednako cijelom ili uobičajenom vremenu trajanja ispitivanja). Da bi se jasno pokazalo je li vrijednost EC dobivena na temelju brzine rasta ili na temelju prirasta, upotrebljavaju se simboli „E_rC" za brzinu rasta (*growth rate*) i „E_yC" za prirast (*yield*), te se uz njih navodi mjerna varijabla koja je upotrijebljena, npr. E_rC (duljina glavnog izdanka).

Rast je povećanje mjerne varijable, npr. duljine glavnog izdanka, ukupne duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijena, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, tijekom razdoblja ispitivanja.

Brzina rasta (prosječna specifična brzina rasta) logaritamsko je povećanje mjerne varijable tijekom razdoblja izlaganja. Napomena: varijable odgovora povezane s brzinom rasta neovisne su o trajanju ispitivanja sve dok je rast neizloženih kontrolnih organizama eksponencijalan.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (**LOEC** – *lowest observed effect concentration*) najniža je ispitana koncentracija kemikalije pri kojoj je uočen statistički značajan učinak smanjenja rasta (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan učinak jednak onomu koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uvjeta nisu ispunjena, treba detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).

Mjerna varijabla je bilo koja varijabla koja se mjeri kako bi se izrazila krajnja točka ispitivanja s pomoću jedne varijable odgovora ili više različitih varijabli odgovora. U ovoj ispitnoj metodi mjerne varijable su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena.

Monokultura je kultura jedne biljne vrste.

Nekroza je mrtvo (tj. bijelo ili tamno smeđe) tkivo ispitnog organizma.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (**NOEC** – *no observed effect concentration*) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje mjerene varijable koja opisuje biomasu primjenom različitih metoda izračuna. Za ovu ispitnu metodu brzina rasta i prirast su varijable odgovora izvedene iz mjernih varijabli kao što su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena.

Polustatičko ispitivanje (s obnavljanjem) ispitivanje je tijekom kojeg se ispitna otopina zamjenjuje periodički, u određenim razmacima.

▼M7

Statičko ispitivanje ispitna je metoda u kojoj se ispitna otopina ne obnavlja tijekom ispitivanja.

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

Krajnja točka ispitivanja opći je faktor koji se mijenja u odnosu na kontrolu zbog djelovanja ispitivane kemikalije u skladu s ciljem ispitivanja. U ovoj ispitnoj metodi krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim varijablama odgovora koje se temelje na jednoj mjernoj varijabli ili više njih.

Ispitni medij cjelokupni je sintetički uzgojni medij u kojem biljke koje se upotrebljavaju za ispitivanje rastu tijekom izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Ispitivana je kemikalija obično otopljena u ispitnom mediju.

UVCB je tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal.

Prirast je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava biomasa na kraju razdoblja izlaganja umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja. Napomena: kada je rast neizloženih organizama eksponencijalan, varijable odgovora koje se temelje na prirastu smanjivat će se tijekom ispitivanja.

▼M7

Dodatak 2.

MODIFICIRANI ANDREWSOV MEDIJ ZA OSNOVNU KULTURU I PRETKULTURU

Modificirani Andrewsov medij potreban za osnovnu kulturu i pretkulturu pripravlja se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina s dodatkom 3 % saharoze.

Tablica 1.

Sastav Andrewsove hranjive otopine: (ASTM-ov standard E 1913-04)

Pripravljanje hranjivih matičnih otopina			Pripravljanje hranjive otopine
Matična otopina	Kemikalija	Početna masa na 1 000 ml	ml na 5 l hranjive otopine
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Vidjeti u nastavku: matična otopina 3.1.		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Matične otopine mogu se čuvati u hladnjaku šest mjeseci (na 5 – 10 °C). Samo matična otopina 5 ima kraći rok trajanja (dva mjeseca).

Tablica 2.

Pripravljanje matične otopine 3.1 za pripremu matične otopine 3

Kemikalija	Početna masa u g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Nakon što je matična otopina 3.1 pripravljena (tablica 2.), ona se zamrzava u alikvotima od približno 11 ml (na najmanje – 18 °C). Duboko smrznute doze otopine imaju rok trajanja od pet godina.

Da bi se pripravila matična otopina 3, treba odmrznuti matičnu otopinu 3.1, uliti 10 ml te otopine u odmjernu tikvicu od 1 l i dodati ultra čistu vodu do oznake na tikvici.

Za dobivanje modificiranog Andrewsova medija treba uliti približno 2500 ml ultra čiste vode u odmjernu tikvicu od 5 l. Nakon dodavanja po 50 ml svake matične otopine, 90 % odmjerne tikvice treba napuniti ultra čistom vodom i podesiti pH na 5,8.

▼M7

Zatim treba dodati 150 g otopljene saharoze (3 % na 5 l) te napuniti odmjernu tikvicu ultra čistom vodom do oznake. Naposljetku se hranjiva otopina ulijeva u Schottove boce od 1 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobivena hranjiva otopina može ostati sterilna u hladnjaku (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

Modificirani Andrewsov medij za ispitivanje toksičnosti u sustavu bez sedimenta

Deseterostruko koncentrirani modificirani Andrewsov medij koji je potreban za dobivanje ispitnih otopina pripravlja se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina iz tablica 1. i 2. s dodatkom 30 % saharoze. Za dobivanje takvog medija treba uliti približno 100 ml ultra čiste vode u odmjernu tikvicu od 1 l. Nakon dodavanja po 100 ml svake matične otopine treba podesiti pH na 5,8. Zatim treba dodati 30 % otopljene saharoze (300 g na 1 000 ml) te napuniti odmjernu tikvicu ultra čistom vodom do oznake.

Naposljetku se hranjiva otopina ulijeva u Schottove boce od 0,5 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobivena deseterostruko koncentrirana hranjiva otopina može ostati sterilna u hladnjaku (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

▼M7

Dodatak 3.

DRŽANJE OSNOVNE KULTURE

U ovom Dodatku opisuje se osnovna kultura klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum* L ([1]), podvodne vodene dvosupnice, vrste iz porodice krocanja. Između lipnja i kolovoza njezini sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u tlu sustavom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, no neonečišćenim vodama stajaćicama bogatijima kalcijem i s muljevitim supstratom. Klasasti krocanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.

Za osnovnu kulturu u sustavu bez sedimenta u laboratorijskim uvjetima potrebne su sterilne biljke. Sterilne biljke mogu se nabaviti iz ekotoksikološkog laboratorija njemačke Savezne agencije za okoliš (Umweltbundesamt).

Alternativno, ispitni organizmi mogu se pripremiti od nesterilnih biljaka u skladu s ASTM-ovim standardom E 1913-04. Vidjeti u nastavku: ulomak iz ASTM-ova Standardnog vodiča – postupak za uzgoj kulture *Myriophyllum sibiricum* prikupljene u prirodi:

„Ako se počinje raditi s nesterilnim biljkama *Myriophyllum sibiricum* prikupljenima u prirodi, treba prikupljati njihove pupove (turione) u jesen. Pupove treba staviti u akvarije od 20 l koji sadržavaju 5 cm sterilnog sedimenta prekrivenog silikatnim pijeskom ili primjerice materijalom Turface® i 18 l vode odgovarajuće čistoće. Akvariji se prozračuju i drže na temperaturi od 15 °C s brzinom protoka od 200 do 300 μmol m^{-2} s^{-1} 16 sati dnevno. Biljne kulture u akvariju mogu se držati kao rezervni izvor biljaka u slučaju da sterilne biljne kulture budu uništene zbog mehaničkih neispravnosti u odjeljku za uzgoj kulture, zbog kontaminacije, ili iz drugih razloga. Biljke koje se uzgajaju u akvariju nisu sterilne i sterilne kulture ne mogu se držati u šaržnom sustavu za uzgoj kultura. Za sterilizaciju kulture biljke se uklanjaju iz akvarija i ispiru u tekućoj deioniziranoj vodi oko pola sata. Zatim se dezinficiraju u aseptičkim uvjetima u komorama sa laminarnim protokom zraka manje od 20 minuta (dok većina biljnog tkiva ne izbijeli i samo vrh koji raste ostane zelen) u otopini s masenim udjelom natrijeva hipoklorita od 3 % i s 0,01 % odgovarajuće površinski aktivne tvari. Dezinfekcijsko sredstvo i biljni materijal se miješaju. Segmenti s više nodija prenose se u sterilne epruvete za uzgoj kultura koje sadržavaju po 45 ml steriliziranoga modificiranog Andrewsova medija i začepljene su jednostavnim čepovima za epruvete. U svaku ispitnu komoru stavlja se samo jedan biljni segment. Na posude za uzgoj kultura nanosi se laboratorijski film za brtvljenje. Kad se uspostavi sterilna kultura, biljne segmente koji sadržavaju više nodija treba prenositi u nove ispitne komore sa svježim tekućim hranjivim medijima svakih deset do dvanaest dana. Biljke moraju biti sterilne, što se dokazuje uzgojem kultura na agarnim podlogama, i ostati sterilne osam tjedana prije početka ispitivanja.”

Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uvjeti za pripremu materijala, držanje otopina i uzgoj kultura. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Osnovne se kulture mogu držati na slabijoj svjetlosti i nižoj temperaturi (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) duže vrijeme bez premještanja. Uzgojni medij za krocanj

([1]) Carl von Linné (* 23. svibnja 1707. u Råshultu/Älmhultu; † 10. siječnja 1778. u Uppsali).

▼M7

trebao bi biti isti kao onaj koji se upotrebljava za ispitivanje, ali i drugi mediji bogati hranjivim tvarima mogu se upotrebljavati za osnovne kulture.

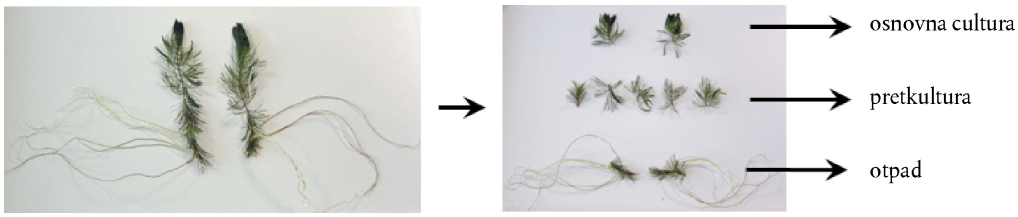
Biljni segmenti raspoređuju se aksenično u nekoliko Erlenmeyerovih tikvica od 500 ml ili/i Fernbachovih tikvica od 2 000 ml, od kojih je svaka napunjena s približno 450 odnosno 1 000 ml modificiranog Andrewsova medija. Zatim se tikvice zatvaraju aksenično celuloznim čepom.

Osim toga, apsolutno je nužno temeljito tretirati opremu plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe. Biljke treba prenositi u svježu hranjivu otopinu otprilike svaka tri tjedna, ovisno o njihovu broju i njihovoj veličini.

Za tu obnovljenu kulturu mogu se upotrebljavati i apeksi i segmenti srednjeg dijela stabljike. Broj i veličina biljaka (ili segmenata biljaka) koje se prenose ovise o tome koliko je biljaka potrebno. Na primjer, može se prenijeti pet dijelova izdanka u Fernbachovu tikvicu, a tri dijela u Erlenmeyerovu tikvicu; svaki je dio dug 5 cm. Odbacuju se svi dijelovi s korijenima ili cvjetovima, mrtvi dijelovi te oni s neobičnim značajkama.

Slika 1.

Rezanje biljaka za osnovnu kulturu i pretkulturu nakon tri tjedana uzgoja.



Kulture biljaka treba uzgajati u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml i Fernbachovim tikvicama od 2 000 ml u inkubatoru s hlađenjem na 20 ± 2 °C sa stalnom svjetlošću od otprilike 100 – 150 µE m^{-2} s^{-1} ili 6 000 – 9 000 lux (iz izvora sobne rasvjete boje „toplo bijelo svjetlo”).

Slika 2.

Uzgoj biljaka u inkubatoru s hlađenjem sa sobnom rasvjetom.



Upotrebljavaju se kemijski čiste (kiselinom očišćene) i sterilne staklene uzgojne posude, a pri rukovanju se primjenjuju aseptički postupci. U slučaju onečišćenja osnovne kulture npr. algama, gljivicama i/ili bakterijama, treba pripremiti novu kulturu ili upotrijebiti osnovnu kulturu iz drugog laboratorija za obnovu kulture.

▼M7

Dodatak 4.

DRŽANJE PRETKULTURE I PRIPREMA ORGANIZAMA ZA ISPITIVANJE

Za dobivanje pretkultura treba izrezati izdanke osnovne kulture u segmente od kojih svaki ima dva pršljena; segmenti se stavljaju u Fernbachove tikvice napunjene modificiranim Andrewsovim medijem (s 3 % saharoze). Svaka tikvica može sadržavati do 50 segmenata izdanka. Ipak, treba paziti da su segmenti vitalni i da nemaju korijenje ni bočne grane ili njihove pupoljke (vidjeti sliku 1. u Dodatku 3.).

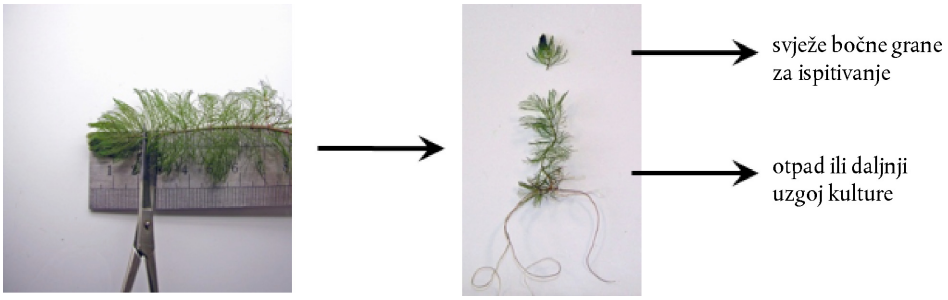
Organizmi pretkulture uzgajaju se 14 dana – 21 dan u sterilnim uvjetima u komori s izmjeničnim fazama svjetlost/tama od 16/8 sati. Intenzitet svjetlosti odabire se u rasponu 100 – 150 μE m^{-2} s^{-1}. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 23 ± 2 °C.

Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast alga, gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uvjeti za pripremu otopina ispitivane kemikalije i uzgoj kultura. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Izdanci se aksenično uklanjaju iz tikvica s pretkulturama, pri čemu se bira što homogeniji materijal. Za svako ispitivanje potrebno je najmanje 60 ispitnih organizama (ispitivanje s osam koncentracija ispitivane kemikalije). Za ispitivanje se uzimaju svježe bočne grane iz pretkultura, skraćuju se na 2,5 cm od baze (mjerenje pomičnim mjerilom) i prenose u čašu sa sterilnim modificiranim Andrewsovim medijem. Te svježe bočne grane mogu se upotrijebiti za ispitivanje toksičnosti klasastog krocnja u sustavu bez sedimenta.

Slika 2.

Rezanje biljaka iz pretkulture za ispitivanje toksičnosti na *Myriophyllum spicatum* u sustavu bez sedimenta.



▼M7

C.51. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SUSTAVU VODA-SEDIMENT

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 239 (2014.). Dostupne su ispitne metode za plutajuće vodene jednosupnice iz roda *Lemna* (1.) i za alge (2.). Te se metode često primjenjuju za prikupljanje podataka o rizicima povezanima s ispitivanim kemikalijama, posebice kemikalijama herbicidnog djelovanja, na neciljane vrste vodenog bilja. Međutim, u nekim slučajevima mogu biti potrebni podatci za dodatne vrste makrofita. U smjernicama koje su nedavno objavljene kao rezultat radionice Društva za toksikologiju i kemiju okoliša (SETAC) o procjeni rizika od pesticida za vodene makrofite (AMRAP) navedeno je da za ispitivane kemikalije mogu biti potrebni podaci za ukorijenjenu makrofitnu vrstu ako je poznato da alge i vrste iz roda *Lemna* nisu osjetljive na način djelovanja predmetne kemikalije ili ako postoji mogućnost razdiobe u sedimentu koja bi dovela do izloženosti apsorpcijom kroz korijen (3.). Na temelju postojećeg znanja i iskustva *Myriophyllum* spp. odabrane su kao preferirana vrsta u slučajevima kada su potrebni podaci za podvodne ukorijenjene dvosupnice (4., 5., 6.). Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti u vodi, već bi im trebalo biti nadopuna radi cjelovitije procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sustavu bez sedimenta (7.).

2. U ovom dokumentu opisuje se ispitna metoda kojom se mogu procijeniti učinci ispitivane kemikalije na ukorijenjenu vodenu biljnu vrstu klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment. Ispitna metoda djelomično se temelji na postojećim metodama (1., 2., 8.) i u njoj se uzimaju u obzir novija istraživanja povezana s procjenom rizika za vodene biljke (3.). Metoda voda-sediment validirana je međunarodnim međulaboratorijskim testom s vrstama krocnja koje su uzgojene u statičkim uvjetima te izložene ispitivanoj kemikaliji u vodenom stupcu (9.). Međutim, ispitni sustav lako se prilagođava za izlaganje u sedimentu s dodatkom ili izlaganje u vodenoj fazi u polustatičkom sustavu ili sustavu s pulsnim doziranjem, iako te metode nisu formalno ispitane međulaboratorijskim testom. Nadalje, opća metoda može se primjenjivati i na druge ukorijenjene podvodne i nadvodne vrste, uključujući druge vrste krocnja (npr. *Myriophyllum aquaticum*) i veliku pirevinu (*Glyceria maxima*) (10.). Za druge vrste može biti potrebno izmijeniti ispitne uvjete, plan i trajanje ispitivanja. Posebno je potrebno dodatno utvrditi odgovarajuće postupke za *Myriophyllum aquaticum*. U ovoj ispitnoj metodi nisu navedene pojedinosti o tim drugim mogućnostima, nego se opisuje standardni pristup za izlaganje *Myriophyllum spicatum* u statičkom sustavu u vodenoj fazi.

3. Ova ispitna metoda primjenjuje se na tvari za koje je ispitna metoda validirana (vidjeti pojedinosti u izvješću o međulaboratorijskom testu (9.)), formulacije ili poznate smjese. Ispitivanje na krocnju može se provesti kako bi se ispunio zahtjev za podatke osnovnog stupnja zbog potencijalne razdiobe u sedimentu ili problema povezanih s načinom djelovanja / selektivnošću ispitivane kemikalije. Laboratorijsko ispitivanje na krocnju može biti potrebno i kao dio višestupanjske strategije za preispitivanje mogućih rizika za vodene biljke. U skladu s konkretnim razlogom za provođenje ispitivanja odredit će se način izlaganja (u vodi ili sedimentu). Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smjese namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

▼M7

NAČELO ISPITIVANJA

4. Ispitivanje je namijenjeno ocjenjivanju učinaka kemikalija na vegetativni rast krocnja (*Myriophyllum*) u standardiziranim medijima (voda, sediment i hranjive tvari). U tu se svrhu vrhovi izdanaka zdravih biljaka bez cvjetova stavljaju u lonce za biljke sa standardiziranim umjetnim sedimentom kojemu se dodaju hranjive tvari kako bi se osigurao prikladan rast biljaka te se potom biljke drže u Smartovu i Barkovu mediju (Dodatak 1.). Nakon razdoblja potrebnog za formiranje korijena biljke se izlažu nizu ispitnih koncentracija u vodenom stupcu. Alternativno, može se simulirati izlaganje u sedimentu dodatkom ispitivane kemikalije umjetnom sedimentu i presađivanjem biljaka u taj sediment s dodatkom. U oba slučaja biljke se potom drže u kontroliranim okolnim uvjetima 14 dana. Učinci na rast određuju se na temelju kvantitativnih procjena duljine izdanka, svježe mase i suhe mase, kao i kvalitativnih zapažanja simptoma kao što su kloroza, nekroza ili deformacije pri rastu.

5. Da bi se kvantificirali učinci kemikalije, rast u ispitnim otopinama uspoređuje se s rastom kontrolnih biljaka te se određuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak (x %) inhibicije rasta i izražava se kao EC_x; „x” može biti bilo koja vrijednost, ovisno o regulatornim zahtjevima, npr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba napomenuti da su procjene EC_{10} i EC_{20} pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od razine učinka koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu EC_{20} koeficijent varijacije trebao bi biti < 20 %.

6. Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na temelju procjena duljine izdanka, svježe mase izdanka i suhe mase izdanka) i prirast (na temelju povećanja duljine izdanka, svježe mase izdanka i suhe mase izdanka) netretiranih i tretiranih biljaka. Na temelju specifične brzine rasta (r) i prirasta (y) zatim se određuju E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) odnosno E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Ako je potrebno, mogu se statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) na temelju procjena prosječnih specifičnih brzina rasta i prirasta.

PODACI O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

8. Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju kemikalija u ispitnom mediju.

9. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati podatke o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturna formula, sastav ako je riječ o tvari s više sastojaka, UVCB tvari, smjesi ili formulaciji, čistoća, topljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline (pK_a), koeficijent razdjeljenja oktanol/voda (K_{ow}), ako je dostupan K_d u sedimente, tlak pare i biorazgradivost. Topljivost u vodi i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u razdoblju ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane kemikalije. Ako se mogu očekivati gubitci ispitivane kemikalije, treba ih kvantificirati i naznačiti daljnje mjere za kontrolu takvih gubitaka. Ako podaci o topljivosti i stabilnosti ispitivane kemikalije / ispitivanih kemikalija nisu pouzdani, preporučuje se da se one procijene u uvjetima ispitivanja, tj. u uzgojnom mediju te pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tijekom ispitivanja. Napomena: kada se ispituju herbicidi koji izazivaju peroksidaciju ovisnu o svjetlosti, trebalo bi upotrebljavati laboratorijsku rasvjetu s jednakom količinom solarnog ultraljubičastog svjetla kao u prirodnoj sunčevoj svjetlosti.

▼M7

10. pH-vrijednost treba mjeriti i prema potrebi prilagođavati u ispitnom mediju. Kontrola pH-vrijednosti ispitnog medija posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili kemikalija koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje kemikalija čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a (11.).

VALJANOST ISPITIVANJA

11. Da bi rezultati ispitivanja bili valjani, srednja ukupna duljina izdanaka i srednja ukupna svježa masa izdanaka kontrolnih biljaka trebaju se najmanje udvostručiti u fazi izlaganja. Osim toga, na samim kontrolnim biljkama, na površini sedimenta i u ispitnom mediju ne smije biti vidljivih znakova kloroze ni onečišćenja drugim organizmima kao što su alge i/ili bakterijski filmovi.

12. Srednji koeficijent varijacije za prirast na temelju mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) u kontrolnim kulturama ne bi trebao prelaziti 35 % među ponovljenim uzorcima.

REFERENTNA KEMIKALIJA

13. Referentnu kemikaliju (ili više njih), kao što je 3,5-diklorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu (9.), trebalo bi povremeno ispitati radi provjere uspješnosti ispitnog postupka. Prema podacima iz međulaboratorijskog testa srednje su vrijednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različite varijable odgovora između 4,7 i 6,1 mg/l (za pojedinosti o očekivanom intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvješće o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna kemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s glavnim ispitivanjem toksičnosti. Vodič za očekivane vrijednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola dostupan je u statističkom izvješću o međunarodnome međulaboratorijskom testu (9.).

OPIS METODE

Ispitna oprema

14. Ispitivanje bi trebalo provoditi u kontroliranim okolnim uvjetima, tj. u uzgojnoj komori, prostoriji ili laboratoriju u kojoj/kojemu se mogu kontrolirati duljina dana, svjetlost i temperatura (vidjeti odjeljak „Ispitni uvjeti”, stavke 56. – 58). Osnovne kulture treba držati odvojeno od ispitnih posuda.

15. Za ispitivanje bi trebalo upotrebljavati staklene ispitne posude kao što su akvariji ili laboratorijske čaše; obično se upotrebljavaju staklene laboratorijske čaše od 2 l (približno 24 cm visoke i 11 cm u promjeru). Međutim, mogu biti prikladne i veće posude uz uvjet da je voda dovoljno duboka da biljke mogu neograničeno rasti i biti uronjene tijekom cijelog ispitivanja.

16. Biljke se mogu stavljati u sediment u plastičnim ili staklenim loncima za biljke (približno 9 cm u promjeru, visine 8 cm i volumena 500 ml). Umjesto lonaca mogu se upotrebljavati staklene čaše, koje i imaju prednost u nekim slučajevima (npr. ispitivanje hidrofobnih kemikalija ili kemikalija s visokim K_{ow}).

17. Veličinu lonca/čaše treba odabrati u skladu s odabirom ispitnih posuda i plana ispitivanja (vidjeti dolje). Ako se primjenjuje plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi), vjerojatno će biti potrebni manji lonci ili veće posude. Ako se primjenjuje plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), lonci i posude trebaju biti odgovarajuće veličine. U svakom slučaju dubina vode trebala bi biti 12 cm iznad vrha sedimenta te bi trebalo zabilježiti omjer površine/volumena sedimenta i površine/volumena vode.

▼M7

Ispitni organizam

18. Opći pristupi opisani u ovoj ispitnoj metodi mogu se primijeniti za ispitivanje niza vodenih biljnih vrsta. Međutim, uvjeti izneseni u ovoj ispitnoj metodi prilagođeni su za ispitivanje vrste klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum*. Ta vrsta pripada porodici dvosupnica *Haloragaceae* (krocnji).

19. Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) podvodna je ukorijenjena vrsta koja uspijeva u vrlo raznolikim uvjetima i nalazi se u vodama stajaćicama i tekućicama. Višegodišnja je biljka koja tijekom zime ugiba, ostaje samo korijen. Biljke obično slobodno cvjetaju i stvaraju sjemenke iako je vegetativno razmnožavanje s pomoću aksilarnih pupoljaka ili dijelova stabljike koji se odvoje prirodno ili zbog djelovanja na biljku često primarna metoda kolonizacije.

Uzgoj kulture ispitnog organizma

20. Biljke se mogu dobiti iz prirodnih populacija ili od dobavljača vodenih biljaka. U svakom slučaja treba dokumentirati podrijetlo biljaka i provjeriti identitet vrste. Pri prikupljanju klasastog krocnja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizirati s drugim vrstama krocnja *(Myriophyllum*). U slučaju dvojbe preporučuje se upotrebljavati provjerene laboratorijske kulture poznatog podrijetla. Biljke koji su bile izložene kemijskim kontaminantima ili su prikupljene iz područja za koje je poznato da su kontaminirana ne bi trebalo upotrebljavati u ovom ispitivanju.

21. U regijama gdje klasasti krocanj nije lako pronaći tijekom zimskih mjeseci može biti potrebno dugoročno držati osnovne kulture u stakleničkim ili laboratorijskim uvjetima. Osnovne kulture treba držati u uvjetima sličnima ispitnim uvjetima, iako se mogu smanjiti osvjetljenje i temperatura kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad za određeno razdoblje nisu planirana ispitivanja na krocnju). Preporučuje se upotrebljavati akvarije i lonce za biljke veće od onih koji se namjeravaju upotrebljavati u ispitivanjima, kako bi bilo dovoljno prostora za širenje. Sastav sedimenta i vode trebao bi biti isti kao onaj koji se namjerava upotrebljavati u ispitivanjima, iako se mogu primijeniti i druge metode obogaćivanja sedimenta (npr. upotreba komercijalnih formulacija za postupno ispuštanje gnojiva).

22. Na osnovnim biljkama ne bi smjelo biti vidljivih znakova kontaminacije bilo kakvim drugim organizmima, uključujući puževe, vlaknaste alge, gljivice i insekte, npr. jajašca ili ličinke noćnog leptira *Paraponyx stratiotata* i ličinke ili odrasle kukce pipe *Eubrychius velutus*. Može biti potrebno isprati biljni materijal u slatkoj vodi kako bi se uklonila vidljiva kontaminacija. Osim toga, trebalo bi nastojati minimizirati kontaminaciju jednostaničnim algama i bakterijama, iako biljni materijal ne mora biti potpuno sterilan. Osnovne kulture treba nadzirati i prema potrebi presađivati kako bi se izbjegla kontaminacija algama i bakterijama. Ako kontaminacija algama i bakterijama uzrokuje probleme, može pomoći prozračivanje osnovnih kultura.

23. U svakom slučaju biljke se uzgajaju/aklimatiziraju u uvjetima koji su slični, ali ne nužno jednaki uvjetima u ispitivanju tijekom odgovarajućeg razdoblja (tj. > 2 tjedna) prije njihove uporabe u ispitivanju.

24. Osnovne kulture u cvatu ne bi se trebale upotrebljavati u ispitivanju jer brzina vegetativnog rasta općenito pada tijekom i nakon cvjetanja.

▼M7

Sediment

25. U ovom ispitivanju preporučuje se upotrebljavati formulirani sediment opisan u nastavku koji se temelji na umjetnom sedimentu iz poglavlja C.28. ovog Priloga (8.). Sediment se priprema kako je opisano u ispitnoj metodi u C.28., osim što se dodaju hranjive tvari kako je opisano u nastavku:

a) 4 – 5 % (suhe mase) treseta (u skladu s 2 ± 0,5 % organskog ugljika) što bliže pH-vrijednosti od 5,5 do 6.,0; važno je da se upotrijebi treset u prahu, fino usitnjen (po mogućnosti veličine čestica < 1 mm) i sušen samo na zraku;

b) 20 % (suhe mase) kaolinske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti više od 30 %);

c) 75 – 76 % (suhe mase) kvarcnog pijeska (trebao bi prevladavati fini pijesak, s više od 50 % čestica između 50 i 200 μm);

d) dodaje se hranjivi vodeni medij tako da konačna šarža sedimenta sadržava 200 mg amonijeva klorida i 200 mg natrijeva fosfata po kilogramu suhog sedimenta te da je udio vlage u konačnoj smjesi od 30 do 50 %;

e) dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kvalitete ($CaCO_3$) kako bi se pH-vrijednost konačne smjese sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5.

26. Podrijetlo treseta, kaolinske gline i pijeska mora biti poznato i dokumentirano. Ako je podrijetlo nepoznato ili uzrokuje zabrinutost, treba provjeriti da dotične komponente nisu kemijski kontaminirane (npr. teškim metalima, organoklornim spojevima, organofosfornim spojevima).

27. Suhe sastojke sedimenta treba homogeno izmiješati te zatim temeljito umiješati hranjivu vodenu otopinu u sediment. Vlažni sediment trebalo bi pripremiti najmanje dva dana prije upotrebe kako bi se omogućilo temeljito natapanje treseta i spriječilo plutanje njegovih hidrofobnih čestica na površini kada se sediment prekrije medijem; prije upotrebe vlažni se sediment može skladištiti u mraku.

28. Za ispitivanje sediment se prenosi u spremnike odgovarajuće veličine, na primjer u lonce za biljke promjera prikladnog za staklene posude (površina sedimenta trebala bi prekrivati približno 70 % ili više površine posude). Ako spremnik ima otvore na dnu, može se umetnuti komad filtar papira kako bi sediment ostao unutar spremnika. Lonci za biljke pune se sedimentom tako da površina sedimenta bude ravna, nakon čega se pokriva tankim slojem (~ 2 do 3 mm) inertnog materijala kao što je pijesak ili fini pijesak za hortikulturu (ili drobljeni koralj) kako bi sediment ostao na mjestu.

Ispitni medij

29. Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se Smartov i Barkov medij (12.). Sastav tog medija naveden je u Dodatku 1. pH-vrijednost medija (vodena faza) na početku ispitivanja treba biti između 7,5 i 8,0 za optimalni rast biljaka.

Plan ispitivanja

30. Za ispitivanje treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih posuda kao ponovljenih uzoraka za netretiranu kontrolu i najmanje četiri ispitne posude kao ponovljene uzorke za svaku od najmanje pet koncentracija.

31. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji.

▼M7

32. Svaka ispitna posuda predstavlja ponovljeni uzorak s tri izdanka. Postoje dvije mogućnosti za uzgoj tri izdanka u svakoj ispitnoj posudi:

— plan ispitivanja A: jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi,

— plan ispitivanja B: tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi,

— drugačiji planovi ispitivanja s jednim izdankom u loncu po ispitnoj posudi prihvatljivi su uz uvjet da se broj ponovljenih uzoraka po potrebi prilagodi kako bi se ispunili potrebni kriteriji valjanosti.

33. Pojedinačne ispitne posude trebalo bi nasumično rasporediti u skupine za tretiranje. Ispitne posude treba nasumično rasporediti i po prostoru za ispitivanje kako bi se minimizirao utjecaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi.

Koncentracije kemikalije i kontrolne skupine

34. Koncentracije bi trebale slijediti geometrijski niz; faktor za koji se ispitne koncentracije razlikuju ne bi smio biti veći od 3,2. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane kemikalije na temelju ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru prikladnih ispitnih koncentracija.

35. Da bi se pri određivanju EC_x osigurala primjerena razina pouzdanosti, EC_x mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Primjerice, ako se procjenjuje EC_{50}, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od EC_{50}. Ako je vrijednost EC_{50} izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno ocijeniti statističku prikladnost modela. Upotrebom više ispitnih koncentracija poboljšat će se interval pouzdanosti za dobivenu vrijednost EC_x.

36. Za određivanje LOEC/NOEC (krajnja točka po izboru), najniža ispitna koncentracija mora biti dovoljno niska da se rast ne razlikuje značajno od rasta kontrolnih biljaka. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno niži od rasta kontrolnih biljaka. Upotrebom više ponovljenih uzoraka poboljšat će se statistička pouzdanost najviše koncentracije bez učinka / analize varijance (ANOVA).

Ispitivanje granične koncentracije

37. Kad ispitivanje za utvrđivanje raspona ukazuje na to da ispitivana kemikalija nema štetno djelovanje u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje topljivosti u ispitnom mediju, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se provesti ispitivanje granične koncentracije kako bi se mogli usporediti odgovori kontrolne skupine s odgovorom jedne tretirane skupine (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici topljivosti, ili 1 000 mg/kg suhog sedimenta). To ispitivanje treba provesti u skladu s općim načelima standardnog ispitivanja koncentracija-odgovor, s iznimkom da se savjetuje povećati minimalni broj ponovljenih uzoraka na šest ispitnih posuda po kontroli i koncentraciji. Rast u kontrolnoj i tretiranoj skupini može se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

Ispitne otopine

38. Ispitne otopine obično se pripremaju razrjeđivanjem matične otopine, koja se priprema otapanjem ili disperzijom ispitivane kemikalije u Smartovu i Barkovu mediju s demineraliziranom (tj. destiliranom ili deioniziranom) vodom (vidjeti Dodatak 1.).

▼M7

39. Najviša ispitna koncentracija ne bi smjela biti veća od topljivosti ispitivane kemikalije ili, ako je riječ o formulaciji, njezine disperzivnosti u ispitnim uvjetima.

40. Za ispitivane kemikalije slabe topljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu otopinu ili disperziju kemikalije upotrebljavajući organsko otapalo ili dispergent kako bi se olakšalo dodavanje točnih količina ispitivane kemikalije u ispitni medij te ubrzalo njezinu disperziju i otapanje. Treba svakako nastojati izbjeći upotrebu takvih otapala ili dispergenata. Pomoćna otapala ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od otapala u širokoj uporabi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru (≤ 100 µl/l). U tim uvjetima sve tretirane skupine i kontrole (s otapalom) trebale bi sadržavati istu koncentraciju otapala odnosno dispergenta. Netretirani kontrolni ponovljeni uzorci koji ne sadržavaju otapalo ili dispergent također su uključeni u plan ispitivanja. Dodatne smjernice o upotrebi dispergenata dostupne su u Smjernicama OECD-a (11.).

ISPITNI POSTUPAK

41. Ispitni postupak varira s obzirom na način primjene ispitivane kemikalije (u vodenoj ili sedimentnoj fazi). Pri odabiru načina izlaganja u ispitivanju (statički postupak ili statički postupak s obnavljanjem, voda s dodatkom ili sediment s dodatkom) trebalo bi razmotriti očekivano ponašanje ispitivane kemikalije u sustavu voda-sediment. Sediment s dodatkom ponekad može imati prednost za kemikalije za koje se očekuje znatna razdioba u sedimentu.

Faza uspostave kulture

42. Od biljaka odabrane kulture odrežu se vrhovi zdravih izdanaka, tj. bez bočnih izdanaka, duljine 6 cm (± 1 cm). Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) u svaki lonac sadi se po jedan izdanak. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi) u svaki lonac sa sedimentom sadi se po četiri do pet vrhova izdanka.

43. U oba slučaja potrebno je posaditi izdanke u više lonaca kako bi se na početku ispitivanja mogle odabrati jednolike biljke te kako bi bilo rezervnih biljaka koje se mogu upotrijebiti za pregled rasta korijena neposredno prije tretiranja i onih koje se mogu ubrati radi mjerenja biomase i duljine izdanka 0. dan.

44. Izdanci se sade tako da približno 3 cm, na kojima se nalaze najmanje dva nodija, budu ispod površine sedimenta.

45. Lonci se zatim prenose u ispitne posude u istim okolnim uvjetima kao za fazu izlaganja te se sedam dana drže u Smartovu i Barkovu mediju kako bi se počeo razvijati korijen.

46. Nakon tog razdoblja nekoliko se biljaka u rezervnim loncima uzima za pregled rasta korijena. Ako nije vidljiv rast korijena (tj. ne vide se vrhovi korijena), fazu uspostave kulture treba produžiti dok ne bude vidljiv rast korijena. Taj se korak preporučuje kako bi se osiguralo da biljke aktivno rastu u vrijeme započinjanja ispitivanja.

▼M7

Odabir jednolikog biljnog materijala

47. Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) jednoliki lonci biraju se prije započinjanja ispitivanja. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), suvišne se biljke uklanjaju kako bi ostale tri biljke jednake veličine i izgleda.

Izlaganje u vodenoj fazi

48. Lonci s biljkama koji su odabrani zbog jednolikosti stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medij. Treba paziti da se izbjegne remećenje sedimenta. Zato se mediji mogu dodavati koristeći se lijevkom ili plastičnim diskom za pokrivanje sedimenta dok se medij ulijeva u ispitne posude, uz uvjet da se disk ukloni odmah nakon toga. Biljni lonci mogu se staviti u ispitne posude i nakon dodavanja medija. U oba slučaja svježi mediji mogu se upotrebljavati na početku faze izlaganja, ako je potrebno, kako bi se smanjilo potencijalno gomilanje algi i bakterija ili omogućila priprema jedinstvenih šarži ispitne otopine među ponovljenim uzorcima.

49. Prije ili nakon dodavanja medija mjeri se duljina izdanka iznad sedimenta.

50. Odgovarajuća količina ispitivane kemikalije može se dodati u ispitni medij prije nego se on doda u ispitne posude. Ispitivana kemikalija može se dodati u medij i nakon što je on dodan u ispitne posude. U tom slučaju treba paziti da se ispitivana kemikalija jednoliko rasporedi u cijelom ispitnom sustavu bez remećenja sedimenta.

51. U svakom slučaju na početku ispitivanja bilježi se izgled ispitnog medija (npr. jasan, mutan itd.).

Izlaganje u sedimentu

52. Sedimenti s dodatkom odabrane koncentracije pripremaju se dodavanjem otopine ispitivane kemikalije izravno u svježi sediment. Matična otopina ispitivane kemikalije otopljena u deioniziranoj vodi miješa se s formuliranim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi, može se otopiti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog otapala (npr. heksan, aceton ili kloroform). Ta se otopina potom miješa s otprilike 10 g finog kvarcnog pijeska po jednoj ispitnoj posudi. Otapalo se pusti da ispari, a pijesak se zatim miješa s prikladnom količinom sedimenta po ispitnoj laboratorijskoj čaši. Samo lako hlapljiva sredstva mogu se upotrebljavati za otapanje, dispergiranje ili emulgiranje ispitivane kemikalije. Treba imati na umu da se u završnoj fazi pripreme sedimenta mora uzeti u obzir volumen/masa pijeska s dodatkom ispitivane kemikalije (sediment stoga treba pripremiti s manje pijeska). Treba paziti da ispitivana kemikalija koja se dodaje u sediment bude temeljito i ravnomjerno raspoređena u njemu.

53. Sediment s dodatkom stavlja se u lonce (kako je opisano). Biljke odabrane zbog jednolikosti i odgovarajućeg sustava korijenja vade se iz lonaca kojima se koristilo u fazi uspostave kulture i presađuju u sediment s dodatkom kako je opisano.

54. Lonci s biljkama stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medij, oprezno (s pomoću lijevka) kako bi se izbjeglo remećenje sedimenta. Prije ili nakon dodavanja medija mjeri se duljina izdanka iznad sedimenta.

▼M7

Održavanje razine vode tijekom ispitivanja

55. Mora se zabilježiti konačni volumen vode i označiti razina vode na svakoj ispitnoj posudi. Ako tijekom ispitivanja voda ispari za više od 10 %, trebalo bi nadomjestiti razinu vode destiliranom vodom. Ako je potrebno, laboratorijske se čaše mogu lagano pokriti prozirnim pokrovom, npr. prozirnim plastičnim poklopcima, kako bi se smanjilo isparavanje i kontaminacija sporama algi.

Ispitni uvjeti

56. Upotrebljava se toplo ili hladno bijelo fluorescentno svjetlo za osvjetljenje od otprilike 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$ izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na površini vode te u ciklusu svjetlost-tama od 16: 8 h. Odstupanja od odabranog osvjetljenja u ispitnom prostoru ne bi smjela biti veća od ± 15 %.

57. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 20 ± 2 °C.

58. pH-vrijednost kontrolnog medija tijekom ispitivanja ne bi se smjela povećati za više od 1,5 jedinica. Ipak, zbog odstupanja za više od 1,5 jedinica ne dovodi se u pitanje valjanost ispitivanja ako se može dokazati da su zadovoljeni navedeni kriteriji valjanosti.

Trajanje ispitivanja

59. Razdoblje izlaganja traje 14 dana.

Mjerenja i analitička određivanja

60. Nakon faze uspostave kulture i neposredno prije tretiranja (tj. 0. dan) rezervne biljke iz pet nasumično odabranih lonaca za plan s tri biljke u loncu ili 15 lonaca za plan s jednom biljkom u loncu izdvajaju se za procjenu duljine izdanka i svježe i suhe mase kako je opisano u nastavku.

61. Za biljke koje se prenose u fazu izlaganja provode se sljedeće procjene, kako je prikazano u tablici 1.:

— duljina glavnog izdanka, broj bočnih izdanaka i duljina bočnih izdanaka bilježe se barem na kraju razdoblja izlaganja (14. dan),

— vizualne procjene zdravlja biljke bilježe se najmanje tri puta tijekom razdoblja izlaganja (npr. 0., 7. i 14. dan),

— procjene svježe i suhe mase izdanaka provode se na kraju ispitivanja (14. dan).

62. Duljina izdanka mjeri se pomičnim mjerilom. Ako ima bočnih izdanaka potrebno je utvrditi njihov broj i duljinu.

63. Pri vizualnim procjenama zdravlja biljaka bilježe se izgled biljaka i opće stanje ispitnog medija. Zapažanja koja je potrebno zabilježiti uključuju:

— nekrozu, klorozu i druge promjene boje, npr. pretjerano crvenilo u odnosu na kontrolne biljke,

— kontaminaciju bakterijama ili algama,

— anomalije rasta kao što su zaostajanje u rastu, promjene duljine između nodija, deformacije izdanaka/listova, umnožavanje bočnih izdanaka, gubitak listova, gubitak turgora i fragmentacija stabljike,

▼M7

— zdravlje korijena procjenjuje se vizualno na kraju ispitivanja uz pažljivo ispiranje sedimenta s korijena kako bi se mogao promatrati sustav korijena. U nastavku je prijedlog ljestvice za procjenu u odnosu na kontrolne biljke:

1. nema korijena

2. malo korijena

3. srednje razvijen korijen

4. vrlo dobro razvijen korijen, slično kontrolnim biljkama.

64. Svježa masa procjenjuje se na početku i kraju ispitivanja; izdanak se odreže na razini sedimenta i suši upijajućim materijalom prije vaganja. Treba paziti da se uklone čestice sedimenta koje mogu prionuti uz dno izdanka. Izdanak se zatim stavi u sušionik na otprilike 60 °C i suši do konstantne mase, a zatim se ponovno važe i bilježi se suha masa.

65. U tablici 1. prikazane su minimalne biološke procjene koje je potrebno provesti tijekom ispitivanja.

Tablica 1.

Plan procjena

Dan nakon tretiranja	*Myriophyllum spicatum*			
	Duljina izdanka, duljina i broj bočnih izdanaka	Vizualne procjene izdanaka	Svježa i suha masa izdanka, vizualna procjena korijenja	pH O_2
0	P	P	P	P
4	—	—	—	—
7	—	P	—	P
14	P	P	P	P

P znači da su tada potrebne procjene
— znači da nisu potrebna mjerenja

Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

66. Najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, s pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti temperaturu medija u dodatnoj posudi koja se drži u istim uvjetima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

67. pH ispitnog medija i koncentraciju u njemu otopljenog kisika treba provjeriti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tijekom ispitivanja te na kraju u svim posudama kao ponovljenim uzorcima. Mjerenja bi trebalo provoditi uvijek u isto vrijeme dana. Ako se jedna otopina upotrebljava za pripremu svih ponovljenih uzoraka pojedinih ispitnih koncentracija, dovoljno je jedno mjerenje za svaku takvu otopinu 0. dan.

68. Osvjetljenje bi trebalo mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji u točkama jednakima razini površine vode. Mjerenja bi trebalo provesti najmanje jedanput na početku ispitivanja ili tijekom ispitivanja. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjecat će na izmjerenu

▼M7

vrijednost. Sferičnim senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim” senzorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetočkasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.

Analitička mjerenja ispitivane kemikalije

69. Pravilna primjena ispitivane kemikalije trebala bi biti potkrijepljena analitičkim mjerenjima koncentracija ispitivane kemikalije.

70. Uzorke vode za analizu ispitivane kemikalije trebalo bi prikupiti ubrzo nakon početka ispitivanja (tj. na dan primjene za stabilne ispitivane kemikalije ili jedan sat nakon primjene za kemikalije koje nisu stabilne) i na kraju ispitivanja za sve ispitne koncentracije.

71. Koncentracije u sedimentu i pornoj vodi sedimenta trebalo bi odrediti na početku ispitivanja i na kraju ispitivanja, barem u najvišoj ispitnoj koncentraciji, osim ako je poznato da su ispitivane kemikalije stabilne u vodi (> 80 % nazivne koncentracije). Možda neće biti potrebno provoditi mjerenja u sedimentu i pornoj vodi ako je razdioba ispitivane kemikalije između vode i sedimenta jasno određena u ispitivanju vode/sedimenta u sličnim uvjetima (npr. omjer sedimenta i vode, način uvođenja kemikalije, vrsta sedimenta).

72. Uzorkovanje sedimenta na početku ispitivanja vjerojatno bi negativno utjecalo na ispitni sustav. Stoga mogu biti potrebne dodatne tretirane ispitne posude kako bi se olakšala analitička određivanja na početku i kraju ispitivanja. Slično tomu, ako se smatra da su potrebne procjene na polovici razdoblja ispitivanja, tj. 7. dan, a za analize su potrebni veliki uzorci sedimenta koji se ne mogu lako uzeti iz ispitnog sustava, analitička određivanja trebalo bi provoditi s pomoću dodatnih ispitnih posuda koje su tretirane na isti način kao posude kojima se koristi za biološke procjene.

73. Za izoliranje međuprostorne vode preporučuje se centrifugiranje na, primjerice, 10 000 g i 4 °C 30 minuta. Međutim, ako je dokazano da se ispitana kemikalija ne apsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi ako je uzorak premalen.

74. U polustatičkim ispitivanjima (izloženost u vodenoj fazi) kada se očekuje da koncentracija ispitivane kemikalije / ispitivanih kemikalija neće ostati u granicama od 20 % nazivne koncentracije tijekom razdoblja ispitivanja bez obnavljanja ispitnih otopina, trebalo bi pri svakom obnavljanju uzorkovati i upotrijebljene i svježe pripremljene ispitne otopine za analize koncentracije ispitivane kemikalije.

75. Za ispitivanja u kojima izmjerena početna koncentracija ispitivane kemikalije nije u granicama od 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar raspona od 80 do 120 % početne koncentracije), kemijska se određivanja mogu provoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji.

76. U svakom slučaju određivanje koncentracija ispitivane kemikalije potrebno je provesti samo na jednoj posudi po ispitnoj koncentraciji. Druga je mogućnost za analizu objediniti ispitne otopine svih ponovljenih uzoraka za svaku koncentraciju.

77. Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane kemikalije tijekom cijelog ispitivanja održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata i naknadno izvođenje krajnih točaka mogu se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima.

▼M7

78. U tim slučajevima koncentracije s učinkom trebale bi se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim koncentracijama vode na početku ispitivanja.

79. Međutim, ako postoji dokaz da je koncentracija padala (tj. nije se održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije u tretiranom prostoru) tijekom ispitivanja, analiza rezultata trebala bi se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane kemikalije u tretiranom prostoru (11.).

PROCJENA PODATAKA

80. Kada je potrebno upotrijebiti otapalo ili dispergent, podaci iz kontrola s otapalom i netretiranih kontrola mogu se objediniti radi statističke analize, uz uvjet da odgovori kontrola s otapalom i netretiranih kontrola nisu statistički značajno različiti.

Varijable odgovora

81. Svrha je ispitivanja odrediti učinke ispitivane kemikalije na vegetativni rast ispitne vrste s pomoću dvije varijable odgovora, prosječne specifične brzine rasta i prirasta, kako slijedi:

Prosječna specifična brzina rasta

82. Ta varijabla odgovora temelji se na promjenama logaritama ukupne duljine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suhe mase izdanka tijekom vremena u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Izračunava se za svaki ponovljeni uzorak svake kontrolne i tretirane skupine. Za svaki ponovljeni uzorak treba izračunati srednju duljinu i masu triju biljaka po ispitnoj posudi (ponovljenom uzorku) te zatim brzinu rasta primjenom sljedeće formule:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemu je:

μ_{i-j}: prosječna specifična brzina rasta od vremena i do vremena j

N_i: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i

N_j: mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j

t: vremensko razdoblje od i do j

83. U skladu s odgovorima ponovljenih uzoraka treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta s procjenama varijance za svaku tretiranu i kontrolnu skupinu.

84. Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo razdoblje ispitivanja (vrijeme „i” u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j” kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance.

▼M7

85. Postotak inhibicije brzine rasta (I_r) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu skupinu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:

% Ir: postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta

μC: srednja vrijednost μ u kontroli

μT: srednja vrijednost μ u tretiranoj skupini

Prirast

86. Ta varijabla odgovora temelji se na promjenama ukupne duljine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suhe mase izdanka tijekom vremena u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Srednji postotak inhibicije prirasta (% Iy) za svaku tretiranu skupinu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

pri čemu je:

% I_y: postotak smanjenja prirasta

b_C: konačna biomasa u kontrolnoj skupini umanjena za početnu biomasu

b_T: konačna biomasa u tretiranoj skupini umanjena za početnu biomasu

Prikaz krivulja koncentracija-odgovor

87. Treba izraditi krivulje koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y), izračunanog kako je opisano, i logaritma koncentracije ispitivane kemikalije.

Procjena EC_x

88. Procjene EC_x (npr. EC_{50}) trebale bi se temeljiti i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta (E_rC_x) i na prirastu (E_yC_x), a svaka od njih bi se pak trebala temeljiti na ukupnoj svježoj masi izdanka, ukupnoj suhoj masi izdanka te ukupnoj duljini izdanka.

89. Treba napomenuti da vrijednosti EC_x izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultatima ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uvjeta ove ispitne metode, vrijednosti EC_x na temelju prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) u većini će slučajeva biti više od rezultata na temelju prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti tih dviju varijabli odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

Statistički postupci

90. Cilj je regresijskom analizom dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor. Ako se provede linearizacijska transformacija podataka odgovora, npr. u jedinice probit, logit ili Weibullova modela (13.), može se provesti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno povećati te

▼M7

tako otežati analizu (13.). Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i moraju se posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi (14., 15., 16. i 17.).

91. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti EC_x na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Za svaku procjenu određuju se granice pouzdanosti od 95 %, a valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu trebalo bi provesti na temelju odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na temelju srednjih vrijednosti tretiranih skupina.

92. Ako raspoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”) (18.).

93. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je usporediti srednje vrijednosti tretiranih skupina primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajućeg testa (npr. Dunnettov ili Williamsov test) (19., 20., 21., 22.). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka normalne distribucije i homogenosti varijanci ANOVA-e. To bi trebalo provjeriti Shapiro-Wilksovim testom (normalna razdioba) ili Leveneovim testom (homogenost varijanci). Ako pretpostavka normalne razdiobe i homogenosti varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci i/ili devijacija od normalne razdiobe prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Bonferroni-Welchov t-test, Jonckheere-Terpstrin „step-down” test i Bonferronijev test jednakovrijednosti medijana. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (16.).

IZVJEŠĆIVANJE

94. Izvješće o ispitivanju treba obuhvaćati sljedeće podatke:

Ispitivana kemikalija

tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd.,

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

— opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

Ispitne vrste

— znanstveni naziv i podrijetlo.

Ispitni uvjeti

— trajanje i uvjeti faze uspostave kulture,

— ispitni postupak (statički, polustatički, s pulsnim doziranjem),

▼M7

— datum početka i trajanje ispitivanja,

— ispitni medij, tj. sediment i tekući hranjivi medij,

— opis plana ispitivanja: komora/prostorija za uzgoj ili laboratorij, ispitne posude i pokrovi, količine otopina, duljina i masa ispitnih biljaka po ispitnoj posudi na početku ispitivanja, omjer površine sedimenta i površine vode, omjer volumena sedimenta i vode,

— ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,

— način pripreme matičnih i ispitnih otopina, uključujući eventualnu upotrebu otapala ili dispergenata,

— temperatura tijekom ispitivanja,

— izvor svjetlosti, osvjetljenje ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$),

— pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medija te izgled ispitnih medija na početku i na kraju ispitivanja,

— koncentracije kisika,

— metoda analize s odgovarajućim podacima za procjenu kvalitete (validacijske studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

— metode određivanja mjernih varijabli, npr. duljine, suhe mase, svježe mase,

— sva odstupanja od ove ispitne metode.

Rezultati

— neobrađeni podaci: duljina izdanaka i masa izdanaka pojedinih biljaka / svih biljaka u pojedinom loncu i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju i analizi u skladu s planom procjena iz tablice 1.,

— srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,

— krivulje rasta za svaku koncentraciju,

— vrijeme udvostručenja / brzina rasta u kontroli na temelju duljine i svježe mase izdanka, uključujući koeficijent varijacije za prirast svježe mase,

— izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,

— grafički prikaz odnosa koncentracija-učinak,

— procjene toksičnih krajnjih točaka za varijable odgovora, npr. EC_{50}, i povezani intervali pouzdanosti, ako se izračunavaju LOEC i/ili NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,

— ako se primjenjuje ANOVA, jačina učinka koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj skupini,

▼M7

— svi vidljivi znakovi fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim otopinama,

— rasprava o rezultatima, uključujući i sve utjecaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

LITERATURA

1. Poglavlje C.26. ovog Priloga*: Test inhibicije rasta Lemna sp.*

2. Poglavlje C.3. ovog Priloga: Test inhibicije rasta slatkovodnih algi i cijanobakterija.

3. Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14. – 16. siječnja 2008.

4. Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, str. 199-206.

5. ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

6. Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, str. 715-722.

7. Poglavlje C.50. ovog Priloga: Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu bez sedimenta.

8. Poglavlje C.28. ovog Priloga: Test toksičnosti trzalaca (*Chironomidae*) u vodi iz sedimenta s vodom obrađenom spikingom.

9. Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

10. Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, str. 231-237.

11. OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

12. Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, str. 251-263.

13. Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, str. 713-718.

14. Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, str. 157-167.

15. Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

16. OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

17. Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, str. 93-96.

▼**M7**

18. Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

19. Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, str. 1096-1121.

20. Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, str. 482-491.

21. Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, str. 103-117.

22. Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, str. 519-531.

▼**M7**

Dodatak 1.

SASTAV SMARTOVA I BARKOVA MEDIJA

Sastojak	Količina reagensa koji se dodaje u vodu (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (po uspostavljanju ravnoteže sa zrakom)	7,9

(*) demineralizirana (tj. destilirana ili deionizirana) voda.

▼M7

Dodatak 2.

DEFINICIJE

Biomasa je svježa i/ili suha masa žive tvari u populaciji. U ovom ispitivanju biomasa je zbroj glavnog izdanka, svih bočnih grana i svog korijenja.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Kloroza je promjena zelene boje ispitnog organizma, posebno pršljena, u žućkastu.

ECx je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja uzrokuje smanjenje rasta klasastog krocnja od x % (npr. 50 %) u određenom razdoblju izlaganja (koje treba posebno navesti ako nije jednako cijelom ili uobičajenom vremenu trajanja ispitivanja). Da bi se jasno pokazalo je li vrijednost EC dobivena na temelju brzine rasta ili na temelju prirasta, upotrebljavaju se simboli „E_rC" za brzinu rasta (*growth rate*) i „E_yC" za prirast (*yield*), te se uz njih navodi mjerna varijabla koja je upotrijebljena, npr.E_rC (duljina glavnog izdanka).

Rast je povećanje mjerne varijable, npr. duljine glavnog izdanka, ukupne duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijena, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, tijekom razdoblja ispitivanja.

Brzina rasta (prosječna specifična brzina rasta) logaritamsko je povećanje mjerne varijable tijekom razdoblja izlaganja. Napomena: varijable odgovora povezane s brzinom rasta neovisne su o trajanju ispitivanja sve dok je rast neizloženih kontrolnih organizama eksponencijalan.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC – *lowest observed effect concentration*) najniža je ispitana koncentracija kemikalije pri kojoj je uočen statistički značajan učinak smanjenja rasta (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan učinak jednak onomu koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uvjeta nisu ispunjena, treba detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).

Mjerna varijabla je bilo koja varijabla koja se mjeri kako bi se izrazila krajnja točka ispitivanja s pomoću jedne varijable odgovora ili više različitih varijabli odgovora. U ovoj ispitnoj metodi mjerne varijable su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena.

Monokultura je kultura jedne biljne vrste.

Nekroza je mrtvo (tj. bijelo ili tamno smeđe) tkivo ispitnog organizma.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC – *no observed effect concentration*) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje mjerene varijable koja opisuje biomasu primjenom različitih metoda izračuna. Za ovu ispitnu metodu brzina rasta i prirast su varijable odgovora izvedene iz mjernih varijabli kao što su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena.

Polustatičko ispitivanje (s obnavljanjem) ispitivanje je tijekom kojeg se ispitna otopina zamjenjuje periodički, u određenim razmacima.

Statičko ispitivanje ispitna je metoda u kojoj se ispitna otopina ne obnavlja tijekom ispitivanja.

▼M7

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

Krajnja točka ispitivanja opći je faktor koji se mijenja u odnosu na kontrolu zbog djelovanja ispitivane kemikalije u skladu s ciljem ispitivanja. U ovoj ispitnoj metodi krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim varijablama odgovora koje se temelje na jednoj mjernoj varijabli ili više njih.

Ispitni medij cjelokupni je sintetički uzgojni medij u kojem biljke koje se upotrebljavaju za ispitivanje rastu tijekom izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Ispitivana je kemikalija obično otopljena u ispitnom mediju.

UVCB je tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal.

Prirast je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava biomasa na kraju razdoblja izlaganja umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja. Napomena: kada je rast neizloženih organizama eksponencijalan, varijable odgovora koje se temelje na prirastu smanjivat će se tijekom ispitivanja.

▼M8

C.52. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA PRODULJENOJ GENERACIJI MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 240 (2015.). U ispitivanju reproduktivne toksičnosti na produljenoj generaciji medake (MEOGRT, engl. *Medaka Extended One Generation Reproduction Test*) opisuje se sveobuhvatna ispitna metoda koja se temelji na ribama koje su izlagane tijekom više generacija kako bi se dobili podaci o ekološkoj opasnosti i procjeni rizika kemikalija, uključujući navodno endokrino disruptivne kemikalije (EDC). Izlaganje u ispitivanju MEOGRT nastavlja se do valjenja (do dva tjedna nakon oplodnje) u drugoj (F2) generaciji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se obrazložila korisnost produljenja generacije F2 poslije točke valjenja; trenutačno ne postoji dovoljno informacija koje pružaju relevantne uvjete ili kriterije koji zahtijevaju produljenje generacije F2. Međutim, ova se ispitna metoda može ažurirati nakon što se razmotre nove informacije i podaci. Na primjer, smjernice o produljenju generacije F2 reprodukcijom potencijalno bi mogle biti korisne u određenim okolnostima (npr. kemikalije s velikim potencijalom biokoncentracije ili naznake transgeneracijskih učinaka kod drugih taksona). Ova ispitna metoda može se primjenjivati za procjenu potencijalnih kroničnih učinaka kemikalija, uključujući potencijalno endokrino disruptivne kemikalije, na ribe. U metodi se najveća važnost pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i razmnožavanje) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s učinkom (ECx), iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste u kojima povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željene vrijednosti ECx može biti nepraktično, a može dovesti i do znatne zabrinutosti za dobrobit životinja zbog velikog broja upotrijebljenih životinja. Za kemikalije za koje nije potrebna procjena u više generacija ili za kemikalije koje nisu potencijalno endokrino disruptivne kemikalije mogu biti primjerenije druge ispitne metode (1.). Japanska medaka primjerena je vrsta za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola (2.), što se smatra ključnom sastavnicom ove ispitne metode. Specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku. Druge riblje vrste manje veličine (npr. zebrica) mogu se prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja.

2. Ovom se ispitnom metodom mjeri nekoliko bioloških krajnjih točaka. Najveća važnost pridaje se potencijalnim štetnim učincima na parametre koji su relevantni za populaciju, uključujući preživljavanje, ukupni razvoj, rast i reprodukciju. Potom se, kako bi se pružile mehanističke informacije i poveznica s rezultatima iz drugih vrsta terenskih istraživanja i laboratorijskih studija ako postoje *a posteriori* dokazi da kemikalija potencijalno djeluje kao endokrini disruptor (npr. androgena ili estrogena aktivnost u drugim testovima i analizama), dobivaju druge korisne informacije mjerenjem mRNA za vitelogenin (*vtg*) (ili proteina vitelogenina, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih obilježja (SSC) koja se odnose na genetski spol te procjenom histopatologije. Treba napomenuti da, ako se ne sumnja u to da su ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti endokrino disruptivne kemikalije, možda neće biti potrebno mjeriti te sekundarne krajnje točke te mogu biti primjerenije studije koje zahtijevaju manje resursa i manji broj životinja (1.). Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

▼M8

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa predviđa se da će se ispitna metoda revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. Podaci se mogu upotrebljavati na petoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija (3.). Ispitna metoda započinje izlaganjem odraslih riba (generacija F0) ispitivanoj kemikaliji tijekom faze reprodukcije. Izlaganje se nastavlja tijekom razvoja i reprodukcije u generaciji F1 i valjenja u generaciji F2; stoga test omogućuje da se procijene i strukturni i aktivacijski endokrini putovi. Pri tumačenju krajnjih točaka povezanih s endokrinim sustavom može se primijeniti pristup snage dokaza.

4. U ispitivanju treba sudjelovati dovoljno jedinki kako bi se osigurala dovoljna snaga za procjenu krajnjih točaka relevantnih za reprodukciju (vidjeti Dodatak 3.), uz istovremeno osiguravanje upotrebe najmanjeg broja životinja potrebnog za ispitivanje radi dobrobiti životinja. Zbog velikog broja životinja koje se koriste važno je pažljivo razmotriti potrebu za provedbom ispitivanja u odnosu na postojeće podatke koji možda već sadržavaju relevantne informacije o brojnim krajnjim točkama u ispitivanju MEOGRT. OECD-ov okvir za ispitivanje toksičnosti za ribe može pružiti određene smjernice u tom pogledu (1.).

5. Ispitna metoda osmišljena je prvenstveno za razlikovanje učinaka jedne tvari. Međutim, ako je potrebno ispitivanje smjese, trebalo bi razmotriti hoće li se njime dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.

6. Prije započinjanja ispitivanja važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ispitivanje započinje izlaganjem spolno zrelih mužjaka i ženki (najmanje 12 tjedana nakon oplodnje) u uzgojnim parovima u razdoblju od tri tjedna, tijekom kojih se ispitivana kemikalija distribuira u organizmu roditeljske generacije (F0) u skladu s njezinim toksikokinetičkim ponašanjem. Jajašca se prikupljaju što bliže prvom danu četvrtog tjedna kako bi se započela generacija F1. Tijekom uzgoja generacije F1 (ukupno 15 tjedana) procjenjuju se valjivost i preživljavanje. Osim toga ribe se uzorkuju 9–10 tjedana nakon oplodnje radi razvojnih krajnjih točaka i mriješćenje se procjenjuje tri tjedna, od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Generacija F2 započinje se nakon trećeg tjedna procjene reprodukcije i uzgaja se do završetka valjenja.

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

8. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:

— tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom,

— tijekom cijelog trajanja studije srednja temperatura vode treba biti od 24 do 26 °C. Kratka odstupanja pojedinačnih akvarija od srednje vrijednosti ne bi trebala biti veća od 2 °C,

▼M8

— srednja potencijalna plodnost kontrola u svakoj generaciji (F0 i F1) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno. Plodnost svih jajašaca koja nastanu tijekom procjene treba biti veća od 80 %. Osim toga, 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba proizvesti više od 20 jajašaca po paru dnevno,

— valjivost jajašaca u kontrolama treba biti ≥ 80 % (prosjek) (u svakoj od generacija F1 i F2),

— preživljavanje u kontrolama (F1) nakon valjenja do tri tjedna nakon oplodnje odnosno od tri tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju F1 (tj. 15 tjedana nakon oplodnje) treba biti ≥ 80 % (prosjek) odnosno ≥ 90 % (prosjek),

— trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

Kad je riječ o temperaturi vode, iako to nije kriterij valjanosti, ponavljanja u okviru tretiranja ne bi se trebala međusobno statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

9. Iako se smanjena reprodukcija može uočiti u skupinama s većim izlaganjem, reprodukcija bi se trebala odvijati u dovoljnoj mjeri barem u trećoj najvišoj skupini i svim nižim skupinama generacije F0 kako bi se napunili inkubatori za valjenje. Nadalje, u trećoj najvišoj skupini i nižim skupinama izlaganja u generaciji F1 treba doći do primjerenog preživljavanja embrija kako bi se omogućila procjena krajnjih točaka na uzorcima riba koje nisu odrasle (vidjeti stavke 36. i 38. te Dodatak 9.). Osim toga, treba doći do barem minimalnog preživljavanja nakon valjenja (~ 20 %) u drugoj najvišoj skupini izlaganja generacije F1. To nisu kriteriji valjanosti sami po sebi, već preporuke kojima se omogućuje izračun pouzdanih vrijednosti NOEC.

10. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODE

Oprema

11. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

(a) mjerači kisika i pH-vrijednosti;

(b) oprema za utvrđivanje tvrdoće i lužnatosti vode;

(c) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje;

(d) akvariji izrađeni od kemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustoću nasada (vidjeti Dodatak 3.);

(e) vaga prikladne točnosti (odnosno točnost u rasponu od ±0,5 mg).

▼M8

Voda

12. Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. Ona treba biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane kemikalije) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ±0,5 pH jedinica.

Sustav izlaganja

13. Nisu utvrđeni dizajn i materijali koji se upotrebljavaju za sustav izlaganja. Za izgradnju ispitnog sustava koji nije kontaminiran tijekom prethodnih ispitivanja treba upotrebljavati staklo, nehrđajući čelik ili drugi kemijski inertan materijal. Za potrebe ovog ispitivanja primjeren sustav izlaganja može se sastojati od kontinuiranog protočnog sustava (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.).

Ispitne otopine

14. Glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitna otopina u svakoj komori primjereno se obnavlja (npr. najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do 16 obnavljanja volumena dnevno ili do protoka od 20 ml/min), ovisno o stabilnosti ispitivane kemikalije i kvaliteti vode.

15. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (14.). Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma” povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a 23 za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (15.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih podataka o upotrebi otapala. Ako se upotrebljavaju otapala nosači, uz (negativne) kontrole bez otapala (samo voda za razrjeđivanje) treba procijeniti i primjerene kontrole s otapalom. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo

▼M8

nosač najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (15.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr. < 20 µl/l) kako bi se izbjegao mogući učinak otapala na krajnje točke koje se mjere (16.).

Ispitne životinje

Odabir i držanje riba

16. Ispitna je vrsta japanska medaka *Oryzias latipes* zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola. Iako se druge riblje vrste manje veličine mogu prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku (vidjeti stavak 1.). Medaka se lako uzgaja u zatočeništvu; postoje objavljene metode za njezinu kulturu (17., 18. i 19.) te su dostupni podaci iz kratkoročnih ispitivanja smrtonosnog djelovanja, ispitivanja u ranim životnim stadijima i ispitivanja cijelog životnog ciklusa (5., 6., 8., 9. i 20.). Sve se ribe drže u fotoperiodu od 16 sati svjetla i osam sati tame. Ribe se hrane živim ličinkama račića *Artemia* spp. koje se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari.

17. Ako se primjenjuje odgovarajuće gospodarenje životinjama, nije potreban specifičan protokol za uzgoj. Na primjer, medake se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s 240 ličinki riba po spremniku do četiri tjedna nakon oplodnje, a zatim se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s deset riba po spremniku do osam tjedna nakon oplodnje, kada se raspoređuju u uzgojne parove u spremnicima od dvije litre.

Aklimatizacija i odabir riba

18. Ispitne ribe treba odabrati iz iste laboratorijske zalihe koja je najmanje dva tjedna prije ispitivanja aklimatizirana u uvjetima kakvoće vode i osvjetljenja koji su slični ispitnim uvjetima (napomena: to razdoblje aklimatizacije nije razdoblje prije izlaganja *in situ*). Preporučuje se da se ispitne ribe dobiju iz interne kulture jer je prijevoz odraslih riba stresan i može ometati pouzdano mriješćenje. Ribe treba hraniti ličinkama račića Artemia dvaput dnevno tijekom cijelog razdoblja držanja i tijekom faze izlaganja, koje se po potrebi dopunjuju komercijalno dostupnom hranom u listićima. Smatra se da su za početak ovog ispitivanja potrebna najmanje 42 uzgojna para (54 uzgojna para ako je potrebna kontrola s otapalom, djelomično zbog nedostatka prijašnjih podataka kojima se podupire upotreba samo kontrole bez otapala) kako bi se osigurala primjerena replikacija. Osim toga, treba provjeriti ima li svaki uzgojni par generacije F0 gene XX-XY (tj. uobičajeni par spolnih kromosoma za svaki spol) kako bi se spriječilo moguće uključivanje mužjaka kod kojih se spontano javljaju parovi XX (vidjeti stavak 39.).

▼M8

19. Tijekom faze aklimatizacije treba evidentirati smrtnost riba u kulturi i primijeniti sljedeće kriterije nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati:

— smrtnost iznad 10 % populacije kulture u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: odbacuje se cijela šarža,

— smrtnost od 5 % do 10 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: aklimatizacija se nastavlja još sedam dana nakon razdoblja aklimatizacije od dva tjedna; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se cijela šarža,

— smrtnost manja od 5 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: šarža se prihvaća.

20. Ribe se ne smiju liječiti u razdoblju aklimatizacije od dva tjedna prije ispitivanja ni tijekom razdoblja izlaganja te liječenje treba u potpunosti izbjegavati ako je moguće. Ribe s kliničkim znakovima bolesti ne treba koristiti u studiji. Treba voditi evidenciju opažanja i svih profilaktičkih i terapeutskih liječenja tijekom razdoblja kulture koje prethodi ispitivanju.

21. Fazu izlaganja treba započeti spolno dimorfnom odraslom ribom, kojoj je genetski utvrđen spol, iz laboratorijske skupine reproduktivno zrelih životinja koje se uzgajaju na 25 ± 2 °C. Ribe treba identificirati kao dokazane rasplodne životinje (tj. dale su žive potomke) tijekom tjedna koji prethodi izlaganju. Pojedinačne mase riba po spolu u cijeloj skupini koja se koristi u ispitivanju trebale bi se na početku ispitivanja nalaziti u granicama od ±20 % aritmetičke srednje mase istog spola. Prije ispitivanja treba izvagati podzorak riba radi procjene srednje mase. Treba odabrati ribe starosti od najmanje 12 tjedana nakon oplodnje, mase ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

22. Preporučuje se upotreba pet koncentracija kemikalija i kontrole. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija treba razmotriti sve izvore informacija, uključujući kvantitativne odnose strukture i djelovanja (QSAR), primjenu analogije s analognim kemikalijama, rezultate ispitivanja riba kao što su analize akutne toksičnosti (poglavlje C.1. ovog Priloga), kratkoročni reprodukcijski test na ribama (poglavlje C.48. ovog Priloga) i druge ispitne metode, npr. poglavlja C.15., C.37., C.41., C.47. i C.49. ovog Priloga (21., 22., 23., 24., 25. i 26.), ako su dostupni, ili, prema potrebi, ispitivanje za utvrđivanje raspona koje može uključivati fazu reprodukcije. Ako je potrebno, ispitivanje za utvrđivanje raspona može se provesti u uvjetima (kakvoća vode, ispitni sustav, prostor za određeni broj životinja) koji su slični onima koji se upotrebljavaju u konačnom ispitivanju. Ako se mora upotrijebiti otapalo, a nisu dostupni prijašnji podaci, može se upotrijebiti ispitivanje za utvrđivanje raspona kako bi se utvrdila prikladnost otapala. Najviša ispitna koncentracija ne smije biti viša od topljivosti u vodi, 10 mg/l ili 1/10 koncentracije LC50 u 96 h (27.). Najniža koncentracija trebala bi biti manja od najviše koncentracije za faktor od 10 do 100 puta. Upotrebom pet koncentracija u ovom ispitivanju ne omogućuje se samo mjerenje odnosa između doze i odgovora,

▼M8

već se dobiva i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i NOEC, koji su potrebni za procjenu rizika u nekim regulatornim programima ili nadležnostima. Interval između nominalnih koncentracija ispitivane kemikalije između susjednih razina tretiranja obično je ≤ 3,2.

Ponavljanja unutar ispitnih skupina i kontrola

23. Treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih komora s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 7.). Tijekom reproduktivne faze (osim kod generacije F0), replikacijska struktura udvostručuje se za procjenu potencijalne plodnosti i za svako ponavljanje koristi se samo jedan uzgojni par (vidjeti stavak 42.).

24. Uz ispitne koncentracije trebalo bi provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje i, prema potrebi, kontrolu s otapalom. Za kontrole treba upotrijebiti udvostručeni broj komora s ponavljanjem kako bi se osigurala primjerena statistička snaga (tj. za kontrole treba upotrebljavati najmanje 12 ponavljanja). Tijekom reproduktivne faze broj ponavljanja u kontrolama udvostručuje se (tj. najmanje 24 ponavljanja i u svakom je ponavljanju samo jedan uzgojni par koji će se pariti). Nakon reprodukcije kontrolna ponavljanja trebaju sadržavati najviše 20 embrija (riba).

POSTUPAK

Početak ispitivanja

25. Reproduktivno aktivne odrasle ribe koje se upotrebljavaju za započinjanje generacije F0 ispitivanja odabiru se na temelju dva kriterija: dobi (obično više od 12 tjedana nakon oplodnje, ali po mogućnosti ne više od 16 tjedana) i mase (treba biti ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake).

26. Parovi ženki i mužjaka koji ispunjavaju prethodne specifikacije premještaju se kao pojedinačni parovi u svaki spremnik s ponavljanjem, tj. 12 ponavljanja u kontrolama i šest ponavljanja u tretiranjima kemikalijom na početku ispitivanja. Tim se spremnicima nasumično dodjeljuju oznake za tretiranje (npr. T1–T5 i kontrola) i ponavljanje (npr. A–L u kontrolama i A–F u tretiranjima) te se zatim stavljaju u sustav izlaganja s odgovarajućim protokom u svaki spremnik.

Uvjeti izlaganja

27. Potpuni sažetak ispitnih parametara i uvjeta dostupan je u Dodatku 3. Poštovanje tih specifikacija treba dovesti do kontrolnih riba čije su vrijednosti krajnjih točaka slične onima navedenima u Dodatku 4.

28. Otopljeni kisik, pH i temperaturu treba mjeriti u barem jednoj ispitnoj posudi svake ispitne skupine i kontrole tijekom ispitivanja. Ta mjerenja, osim temperature, treba obavljati barem jednom tjedno tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Srednja temperatura vode tijekom cijelog trajanja studije treba biti od 24 do 26 °C. Temperaturu treba mjeriti svakog dana tijekom cijelog razdoblja izlaganja. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ±0,5 pH jedinica. Ponavljanja u tretiranju međusobno se ne bi trebala statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

▼M8

Trajanje izlaganja

29. U ispitivanju se spolno zrele ribe iz generacije F0 izlažu u trajanju od tri tjedna. Četvrtog tjedna, približno na 24. ispitni dan, uspostavlja se generacija F1 i uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju te se evidentiraju njihova masa i duljina (vidjeti stavak 34.). Nakon toga slijedi izlaganje generacije F1 u trajanju od još 14 tjedana (ukupno 15 tjedana za F1) i generacije F2 tijekom dva tjedna do valjenja. Ukupno trajanje ispitivanja iznosi u prvom redu 19 tjedana (tj. do valjenja generacije F2). Vremenski okvir za ispitivanje prikazan je u tablici 2. i dodatno podrobno objašnjen u Dodatku 9.

Režim hranjenja

30. Ribe se mogu hraniti *ad libitum* račićima *Artemia* spp. (stari 24 sata, ličinke), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari, kao što su organoklorni pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-i), poliklorirani bifenili (PCB-i). Treba izbjegavati hranu s povišenom razinom endokrinološki aktivnih tvari (tj. fitoestrogena) koje bi mogle dovesti u pitanje odgovor ispitivanja. Nepojedenu hranu i izmet treba prema potrebi uklanjati iz ispitnih posuda, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona. Stranice i dno svakog akvarija isto treba čistiti jednom ili dvaput tjedno (npr. struganjem s pomoću lopatice). Primjer rasporeda hranjenja dostupan je u Dodatku 5. Količina hrane temelji se na broju riba po ponavljanju. Stoga se količina hrane smanjuje ako se u ponavljanju javi smrtnost.

Analitička utvrđivanja i mjerenja

31. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna saznanja o stabilnosti kemikalije u ispitnom sustavu. Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom ispitivanja, po mogućnosti barem svakog tjedna u jednom ponavljanju za svaku ispitnu skupinu, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna.

32. Brzine protoka sredstva za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim razmacima tijekom ispitivanja (npr. najmanje tri puta tjedno). Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti, tada se rezultati mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. U slučaju kemikalija koje se znatno akumuliraju u ribi, ispitne koncentracije mogu se smanjiti kako ribe rastu. U tim se slučajevima preporučuje da se prilagodi stopa obnavljanja ispitne otopine u svakoj komori kako bi se ispitne koncentracije održale što stabilnijima.

Opažanja i izmjerene krajnje točke

33. Krajnje točke koje se mjere uključuju potencijalnu plodnost, plodnost, valjenje, rast i preživljavanje radi procjene mogućih učinaka na razni populacije. Svakodnevno treba opažati i ponašanje te evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Ostale mehanističke krajnje točke uključuju imunotest za određivanje razine hepatičkog *vtg* mRNA ili proteina VTG (28.), spolne fenotipske markere kao što papile na podrepnoj peraji karakteristične za mužjake, histološku ocjenu gonadnog spola te histopatološku ocjenu bubrega, jetre i gonada (vidjeti popis krajnjih točaka u tablici 1.). Sve se te specifične krajnje točke ocjenjuju u kontekstu utvrđivanja genetskog spola jedinke, na temelju prisustva ili odsustva gena *dmy*, kojim se određuje muški spol medake (vidjeti stavak 41.). Uz to se ocjenjuje i vrijeme mriješćenja. Osim toga, mogu se izvesti jednostavni omjeri fenotipskog spola upotrebom

▼M8

informacija o broju papila na podrepnoj peraji kako bi se pojedinačne medake utvrdile kao fenotipski mužjaci ili ženke. Ne očekuje se da će se ovom ispitnom metodom utvrditi mala odstupanja od očekivanog omjera spolova jer relativno mali broj riba po ponavljanju neće osigurati dovoljnu statističku snagu. Isto tako, tijekom histopatološke ocjene procjenjuju se gonade i provode se znatno pouzdanije analize za procjenu gonadnog fenotipa u kontekstu genetskog spola.

34. Primarni je cilj ove ispitne metode ocijeniti učinke ispitivane kemikalije koji su potencijalno relevantni za populaciju. Mehanističke krajnje točke (VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade) isto mogu pomoći da se utvrdi posreduje li endokrina aktivnost nekim učincima. Međutim, na te mehanističke krajnje točke mogu utjecati i sustavne i druge toksičnosti. Stoga se mogu podrobno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te podrobne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima.

Humano usmrćivanje riba

35. Kod završetka izlaganja generacija F0 i F1 te kada se uzimaju poduzorci riba koje nisu odrasle, ribe treba eutanazirati odgovarajućim količinama otopine anestetika (npr. trikain-metansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l) puferiranima s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijev bikarbonat, CAS.144-55-8) kako bi se smanjilo nadraživanje sluznice. Ako ribe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka te se ribe tretiraju kao smrtnost. Ako se riba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i o tome treba izvijestiti. Riba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje ribe za moguću histopatološku analizu).

Rukovanje jajašcima i ličinkama riba

Prikupljanje jajašaca uzgojnih parova radi razmnožavanja sljedeće generacije

36. Jajašca se prikupljaju prvog dana (ili po potrebi prva dva dana) četvrtog ispitnog tjedna za prelazak s generacije F0 na generaciju F1 te 18. ispitnog tjedna za prelazak s generacije F1 na generaciju F2. Osamnaesti ispitni tjedan odgovara generaciji F1, odraslim ribama 15 tjedana nakon oplodnje. Važno je iz svakog spremnika ukloniti sva jajašca jedan dan prije početka prikupljanja jajašaca kako bi se osiguralo da su sva jajašca koja se prikupe od uzgojnog para iz istog mrijesta. Nakon mriješćenja ženke medake ponekad nose svoja jajašca blizu otvora dok ih ne polože na supstrat. Ako u spremniku nema supstrata, jajašca mogu biti pričvršćena na ženku ili na dnu spremnika. Ovisno o tome gdje se nalaze, jajašca se oprezno uklanjaju sa ženke ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna četvrtog ispitnog tjedna generacije F0 i 18. ispitnog tjedna generacije F1. Sva jajašca prikupljena u okviru tretiranja objedinjuju se prije distribucije u inkubacijske komore.

▼M8

37. Treba ukloniti filamente jajašaca, koji drže jajašca mrijesta na okupu. Oplođena jajašca (do 20) prikupljaju se od svakog uzgojnog para (jedan par po ponavljanju), objedinjuju se prema tretiranju i sustavno distribuiraju u primjerene inkubacijske komore (dodaci 6. i 7.). Upotrebom kvalitetnog disekcijskog mikroskopa mogu se uočiti znakovi rane oplodnje/razvoja kao što su stvaranje fertilizacijske membrane (korion), dioba stanica koja je u tijeku ili nastanak blastule. Komore inkubatora mogu se staviti u posebne „inkubacijske akvarije" koji se uspostavljaju za svako tretiranje (u tom se slučaju u njima moraju izmjeriti parametri kakvoće vode i koncentracije ispitivanih kemikalija) ili u akvarij s ponavljanjem u kojem će se držati izvaljene ličinke (npr. eleutero-embrij). Ako je potreban drugi dan prikupljanja (23. ispitni dan), sva jajašca iz oba dana treba objediniti i zatim sustavno raspodijeliti u svako od ponavljanja tretiranja.

Uzgoj jajašaca do valjenja

38. Oplođena jajašca kontinuirano se protresaju, npr. mjehurićima zraka u inkubatoru jajašaca ili vertikalnim njihanjem inkubatora jajašaca. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (Dodatak 9.). Sedmog dana nakon oplodnje protresanje se zaustavlja ili smanjuje kako bi se jajašca spustila na dno inkubatora. Time se potiče valjenje, do kojeg obično dolazi sljedećeg dana ili za dva dana. Mladunci (mlade ličinke; eleutero-embrij) broje se za svako tretiranje i kontrolu (osnova objedinjenih ponavljanja). Oplođena jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli (obično 16 ili 18 dana nakon oplodnje) smatraju se neodrživima te se odbacuju.

39. U svaki se spremnik s ponavljanjem premješta 12 mladunaca. Mladunci iz inkubacijskih komora objedinjuju se i sustavno distribuiraju u spremnike s ponavljanjem (Dodatak 7.). To se može obaviti nasumičnim odabirom mladunca iz skupine za tretiranje i uzastopnim dodavanjem mladunaca neselektivnim izvlačenjem u akvarij s ponavljanjem. Svaki spremnik treba sadržavati jednak broj (n = 12) izvaljenih ličinki (najviše 20 ličinki u svakom spremniku). Ako nema dovoljno mladunaca da bi se popunila sva ponavljanja tretiranja, preporučuje se da što više ponavljanja ima 12 mladunaca. Mladuncima se sigurno može rukovati s pomoću staklenih pipeta velikog promjera. Svi dodatni mladunci humano se usmrćuju anestetikom. Tijekom nekoliko tjedana prije uspostave uzgojnih parova treba evidentirati dan na koji se u svakom ponavljanju uoči prvo mriješćenje.

Uspostava uzgojnih parova

Obrezivanje peraja i utvrđivanje genotipskog spola

40. Utvrđivanje genotipskog spola rezanjem peraja obavlja se od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje (tj. od 12. do 13. ispitnog tjedna za generaciju F1). Sve ribe u spremniku anesteziraju se (upotrebom odobrenih metoda, npr. IACUC) i uzima se mali uzorak s leđnog ili trbušnog vrha repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (29.). Ribe iz ponavljanja mogu se smjestiti u male kaveze (po mogućnosti jedna riba po kavezu) u spremniku s ponavljanjem. Umjesto toga, u kavezu se mogu držati dvije ribe ako ih se može razlikovati. Jedna je metoda da se pri uzimanju uzorka tkiva repna peraja različito odreže (npr. leđni ili trbušni vrh).

▼M8

41. Genotipski spol medake utvrđuje se identificiranim i sekvenciranim genom (*dmy*) koji se nalazi na Y kromosomu. Prisustvo gena *dmy* ukazuje na jedinku XY bez obzira na fenotip, dok njegovo odsustvo ukazuje na jedinku XX bez obzira na fenotip (30.); (31.). Iz svakog uzorka peraje ekstrahira se deoksiribonukleinska kiselina (DNK), a prisustvo ili odsustvo gena *dmy* može se utvrditi metodama lančane reakcije polimerazom (PCR) (vidjeti Dodatak 9. u poglavlju C.41. ovog Priloga ili dodatke 3. i 4. u literaturi pod 29.).

Utvrđivanje uzgojnih parova

42. Informacije o genotipskom spolu upotrebljavaju se za utvrđivanje uzgojnih parova XX-XY neovisno o vanjskom fenotipu koji se može izmijeniti izlaganjem ispitivanoj kemikaliji. Na dan nakon utvrđivanja genotipskog spola svake ribe nasumično se odabiru dvije ribe XX i dvije ribe XY iz svakog ponavljanja i utvrđuju se dva uzgojna para XX-XY. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY, primjerene ribe treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju. Prioritet je dobiti preporučeni broj ponavljanja uzgojnih parova (12) u svakom tretiranju i u kontrolama (24). Ribe s očiglednim abnormalnostima (problemi s plivaćim mjehurom, deformacije kralježnice, iznimne varijacije u veličini itd.) trebalo bi isključiti pri utvrđivanju uzgojnih parova. Tijekom reprodukcijske faze za generaciju F1 svaki spremnik s ponavljanjem treba sadržavati samo jedan uzgojni par.

Uzorkovanje riba koje nisu odrasle i ocjena krajnjih točaka

Uzorkovanje riba koje nisu u uzgojnim parovima

43. Nakon uspostave uzgojnih parova ribe koje nisu odabrane za daljnji uzgoj humano se usmrćuju radi mjerenja krajnjih točaka riba koje nisu odrasle u ispitnim tjednima od 12. do 13. (F1). Iznimno je važno da se s ribama postupa tako da se genotipski spol utvrđen za odabir uzgojnih parova i dalje može povezati s pojedinačnim ribama. Svi prikupljeni podaci analiziraju se u kontekstu genotipskog spola određene ribe. Svaka se riba upotrebljava za različita mjerenja krajnjih točaka, među ostalim: utvrđivanje stopa preživljavanja juvenilnih riba/riba koje nisu odrasle (od sedmog do 12. ili 13. ispitnog tjedna (F1)), rast u duljinu (standardna duljina može se izmjeriti ako je repna peraja skraćena u svrhu uzorkovanja radi analize genetskog spola). Ukupna duljina može se izmjeriti ako se samo dio repne peraje, leđni ili trbušni, uzorkuje za *dmy* i tjelesnu masu (tj. mokra masa, osušeno upijajućim materijalom), *vtg* mRNA (ili VTG) iz jetre i papile na podrepnoj peraji (vidjeti tablice 1. i 2.). Napominje se da su mase i duljine uzgojnih parova potrebne i za izračun srednjeg rasta u ispitnoj skupini.

Uzorkovanje tkiva i mjerenje vitelogenina

44. Jetra se disecira i treba je spremiti na temperaturu ≤ –70 °C do mjerenja *vtg* mRNA (ili VTG-a). Rep ribe, uključujući repnu peraju, čuva se u odgovarajućem fiksativu (npr. Davidsonov fiksativ) ili se fotografira tako da se papile na podrepnoj peraji mogu prebrojati u kasnijoj fazi. Po želji se istovremeno mogu uzorkovati i sačuvati i druga tkiva (npr. gonade). Koncentraciju VTG-a u jetri treba kvantificirati homolognom ELISA tehnikom (vidjeti preporučene postupke za medaku u Dodatku 6. u poglavlju C.48. ovog Priloga). Umjesto toga, Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) utvrdila je metode za kvantifikaciju vtg mRNA, tj. ekstrakciju mRNA gena *vtg I* iz uzorka jetre i kvantifikaciju broja kopija gena *vtg I* (po nanogramu ukupnog mRNA) s pomoću kvantitativne metode lančane reakcije polimerazom (29.). Umjesto utvrđivanja broja kopija gena *vtg* u kontrolnim i

▼M8

ispitnim skupinama, može se upotrijebiti i metoda koja je ekonomičnija i tehnički manje zahtjevna, odnosno utvrđivanje relativne promjene (omjer) u ekspresiji gena *vtg I* iz kontrolnih i ispitnih skupina.

Sekundarna spolna obilježja

45. U normalnim okolnostima samo spolno zreli mužjaci medake imaju papile, koje se razvijaju kao sekundarno spolno obilježje na kostima bodlje šipčice određenih podrepnih peraja, što čini potencijalni biomarker za endokrino disruptivne učinke. Metoda brojanja papila na podrepnoj peraji (broj kosti bodlje s papilama) nalazi se u Dodatku 8. Isto tako, broj papila na podrepnoj peraji po jedinki upotrebljava se za kategorizaciju te jedinke kao mužjaka ili ženke prema vanjskom fenotipu u svrhu izračuna jednostavnog omjera spolova po ponavljanju. Medaka s bilo kojim brojem većim od nule definira se kao mužjak; medaka bez papila na podrepnoj peraji definira se kao ženka.

Procjena potencijalne i stvarne plodnosti

46. Potencijalna i stvarna plodnost procjenjuju se od prvog do trećeg ispitnog tjedna kod generacije F0 te od 15. do 17. ispitnog tjedna kod generacije F1. Jajašca se prikupljaju svakodnevno od svakog uzgojnog para 21 uzastopan dan. Jajašca se svakog jutra nježno uklanjaju s ulovljenih ženki i/ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna akvarija. I potencijalna i stvarna plodnost svakodnevno se evidentiraju za svaki uzgojni par ponavljanja. Potencijalna plodnost definira se kao broj izmriještenih jajašaca, a stvarna plodnost se funkcionalno definira kao broj oplođenih i živih jajašaca u trenutku brojanja. Jajašca treba prebrojati što prije nakon prikupljanja.

47. Potencijalna plodnost ponavljanja svakodnevno se evidentira kao broj jajašaca po uzgojnom paru koji se analizira preporučenim statističkim postupcima upotrebom srednjih vrijednosti ponavljanja. Plodnost ponavljanja zbroj je plodnih jajašaca koje proizvede uzgojni par podijeljen zbrojem jajašaca koje proizvede taj uzgojni par. Statistički se plodnost analizira kao omjer po ponavljanju. Valjivost ponavljanja broj je mladunaca podijeljen brojem postavljenih embrija (obično 20). Statistički se valjivost analizira kao omjer po ponavljanju.

Uzorkovanje odraslih riba i ocjena krajnjih točaka

Uzorkovanje riba u uzgojnim parovima

48. Nakon 17. ispitnog tjedna (tj. nakon što uspješno započne generacija F2) odrasle ribe iz generacije F1 humano se usmrćuju i ocjenjuju se različite krajnje točke (vidjeti tablice 1. i 2.). Podrepna peraja slika se radi ocjene papila na podrepnoj peraji (vidjeti Dodatak 8.) i/ili se uklanja rep, neposredno ventralno od kloake, te se on fiksira za kasnije brojenje papila. Po želji se tada može uzorkovati i pohraniti dio repne peraje radi provjere genetskog spola (*dmy)*. Po potrebi se može uzeti uzorak tkiva kako bi se ponovila analiza gena *dmy* radi potvrde genetskog spola određene ribe. Zatim se otvara trbušna šupljina kako bi se omogućila perfuzija odgovarajućim fiksativima (npr. Davidsonov fiksativ) prije uranjanja cijelog tijela u fiksativ. Međutim, ako se prije fiksiranja provodi odgovarajući korak permeabilizacije, ne treba se otvarati trbušna šupljina.

▼M8

Histopatologija

49. Svaka se riba histološki ocjenjuje kako bi se utvrdila patologija u gonadnom tkivu (30.; 29.). Kako je navedeno u stavku 33., sustavne ili druge toksičnosti mogu utjecati na ostale mehanističke krajnje točke koje se ocjenjuju u ovoj analizi (tj. VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade). Stoga se mogu podrobno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te podrobne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima. Može se razmotriti „silazno očitavanje" od ispitne skupine s najvećim učinkom (u usporedbi s kontrolom) do tretiranja kod kojeg nema učinka, ali preporučuje se proučavanje smjernica za histopatologiju (29.). Uzorci se obično obrađuju/seciraju, nakon čega ih tumači patolog. Ako se upotrebljava pristup „silaznog očitavanja", napominje se da se u postupku RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) primjenjuje očekivanje da će se s povećanjem razina doza povećati i biološki učinak (patologija). Stoga će se izgubiti statistička snaga ako se promatra samo jedna visoka doza bez srednjih doza. Taj pristup može biti prihvatljiv ako nije potrebna statistička analiza kako bi se utvrdilo da visoka doza nema učinak. Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada.

Ostala opažanja

50. Ispitivanjem MEOGRT dobivaju se podaci koji se mogu upotrijebiti (npr. u pristupu snage dokaza) za istovremeno ocjenjivanje barem dvaju putova nastanka ishoda (AOP-i) koji završavaju narušavanjem reprodukcije: (a) putova kojima posreduje endokrini sustav koji uključuju disrupciju endokrine osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG, engl. *hypothalamus-pituitary-gonadal endocrine axis*) i (b) putova koji uzrokuju smanjenje preživljavanja, rasta (dužina i masa) i reprodukcije putem toksičnosti kojom ne posreduje endokrini sustav. Krajnje točke koje se obično mjere u ispitivanjima kronične toksičnosti kao što su ispitivanje cijelog životnog ciklusa i ispitivanje u ranim životnim stadijima uključene su i u ovo ispitivanje i mogu se upotrebljavati za ocjenu opasnosti koju predstavljaju i načini djelovanja koji nisu posredovani endokrinim sustavom i putovi toksičnosti posredovani endokrinim sustavom. Tijekom ispitivanja svakodnevno treba opažati ponašanje i evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Osim toga, treba evidentirati smrtnost i izračunati preživljavanje do izdvajanja riba (šesti/sedmi ispitni tjedan), preživljavanje od izdvajanja do uzorkovanja riba koje nisu odrasle (od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje) i preživljavanje od uspostave parova do uzorkovanja odraslih riba.

Tablica 1.

Pregled krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT (*)

Faza života	Krajnja točka	Generacija
Embrij (2 tjedna nakon oplodnje)	Valjenje (% i vrijeme potrebno za valjenje)	F1, F2
Juvenilna riba (4 tjedna nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
Riba koja nije odrasla (9 ili 10 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	

▼M8

Faza života	Krajnja točka	Generacija
	Vitelogenin (mRNA ili protein)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Omjer spolova prema vanjskim obilježjima	
	Vrijeme do 1. mrijesta	
Odrasla riba (12–14 tjedana nakon oplodnje)	Razmnožavanje (potencijalna i stvarna plodnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Histopatologija (gonada, jetra, bubreg)	

(*) Ove krajnje točke treba statistički analizirati.

VREMENSKI OKVIR

51. Vremenski okvir za ispitivanje MEOGRT prikazan u tablici 2. prikazuje ispitivanje. Ispitivanje MEOGRT uključuje četiri tjedna izlaganja odraslih riba generacije F0 i 15 tjedana izlaganja generacije F1 te razdoblje izlaganja za drugu generaciju (F2), do valjenja (dva tjedna nakon oplodnje). Aktivnosti tijekom ispitivanja MEOGRT sažete su u Dodatku 9.

Tablica 2.

Izlaganje i vremenski okvir za mjerenje krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT

Izlaganje i vremenski okvir krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT																			
F0	1.	2.	3.	4.															
F1				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	
F2																		1.	2.
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
Oznaka životne faze					**Embrij**					**Ličinke**					**Juvenilna riba**			**Riba koja nije odrasla**	**Odrasla riba**
Krajnje točke																			
Potencijalna plodnost	F_0														F_1				
Plodnost	F_0														F_1				
Valjenje					F_1														F_2
Preživljavanje						F_1						F_1						F_1	
Rast				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenin												F_1							
Sekundarni spol												F_1						F_1	
Histopatologija																		F_1	
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.

- Plan izvođenja pokusa ima sedam skupina ponavljanja
  - pet za tretiranja ispitivanom kemikalijom
  - dva za kontrolna tretiranja (četiri ako se upotrebljava otapalo)
- Plan unutar skupine
  - 12 ponavljanja za reprodukciju, patologiju odraslih riba i SSC (od desetog do 18. tjedna)
  - šest ponavljanja za valjenje, preživljavanje, Vtg te SSC i rast riba koje nisu odrasle (od prvog do devetog tjedna)

SSC: sekundarna spolna obilježja; t.: tjedni;

Vtg: vitelogenin

▼M8

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Statistička analiza

52. Budući da se genotipski spol utvrđuje za sve ispitne ribe, podatke treba analizirati posebno za svaki genotipski spol (tj. mužjaci XY i ženke XX). Ako se to ne učini, znatno će se smanjiti statistička snaga bilo kakve analize. Statističke analize podataka trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u OECD-ovu dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (32.). Dodatne smjernice za statističku analizu navedene su u Dodatku 10.

53. Plan ispitivanja i odabir statističkog testa trebaju omogućiti odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o NOEC-u (32.). Izvješćivanje o koncentracijama s relevantnim učinkom i parametrima može ovisiti o zakonodavnom okviru. Treba utvrditi postotak promjene na svakoj krajnjoj točki koju je važno otkriti ili procijeniti. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da se to omogući. Nije vjerojatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje točke ni da će se moći osmisliti izvediv pokus koji bi zadovoljio te kriterije za sve krajnje točke i stoga je važno usredotočiti se na krajnje točke koje su bitne za pokus pri odgovarajućem planiranju pokusa. U Dodatku 10. dostupni su statistički dijagram toka i smjernice koji mogu pomoći u obradi podataka i odabiru najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uvjet da su znanstveno opravdani.

54. Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tablica kontingencije te primjena odgovarajućih metoda statističke analize na temelju te analize. Za višestruku usporedbu rezultata pojedinačnih koncentracija i kontrola preporučuje se postupak postupnog snižavanja za kontinuirane odgovore (npr. Jonckheere-Terpstraov test). Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, treba upotrijebiti Dunnettov ili Dunnov test (po potrebi nakon primjerene transformacije podataka).

55. Za potencijalnu plodnost jajašca se broje svakodnevno, ali se mogu analizirati kao ukupan broj jajašaca ili kao ponovljeno mjerenje. U Dodatku 10. navode se pojedinosti o načinu analiziranja te krajnje točke. Za histopatološke podatke u obliku ocjene ozbiljnosti razvijen je novi statistički test – RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) (33.).

56. Treba izvijestiti o svim krajnjim točkama uočenima u tretiranjima kemikalijom koja su znatno različita od odgovarajućih kontrola.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitirajućih razina obrade

57. Nekoliko čimbenika uzima se u obzir kako bi se utvrdilo pokazuje li ponavljanje ili cjelokupna obrada očitu toksičnost i je li potrebno ukloniti ih iz analize. Očita toksičnost definira se kao više od četiri smrtna slučaja u bilo kojem ponavljanju od trećeg do devetog tjedna nakon oplodnje koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Ostali znakovi očite toksičnosti uključuju krvarenje, neobična ponašanja, neuobičajene načine plivanja, anoreksiju i bilo koje druge kliničke znakove bolesti. Za subletalne

▼M8

znakove toksičnosti mogu biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno obaviti u odnosu na kontrolnu skupinu s vodom za razrjeđivanje (samo čista voda). Ako je kod tretiranja s najvišim koncentracijama prisutna očita toksičnost, preporučuje se da se ta tretiranja isključe iz analize.

Kontrole s otapalom

58. Uporabu otapala potrebno je uzeti u obzir samo kao krajnje sredstvo, kada se razmotre sve druge opcije prijenosa kemikalije. Ako se upotrebljava otapalo, tada je potrebno paralelno provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće učinke otapala. To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontrolnoj skupini s vodom za razrjeđivanje ili s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

59. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija: fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje.

Ispitni uvjeti:

— fotoperiodi,

— plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj mladunaca po ponavljanju),

▼M8

— način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),

— metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),

— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,

— nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,

— kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

— dokazi o usklađenosti kontrola s općim validacijskim kriterijima,

— sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: valjenje (valjivost i vrijeme potrebno za valjenje) za generacije F1 i F2, preživljavanje nakon valjenja za F1, rast (dužina i tjelesna masa) za F1, genotipski spol i spolna diferencijacija (npr. sekundarna spolna obilježja na temelju papila na podrepnoj peraji i gonadna histologija) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji) za F1, *vtg* mRNA (ili protein VTG) za F1, histopatološka ocjena (gonade, jetra i bubreg) za F1 i reprodukcija (potencijalna i stvarna plodnost) za F0, F1 (vidjeti tablice 1. i 2.),

— pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički testovi ili modeli),

— najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,

— najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $p = 0,05$); EC_x za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,

— sva odstupanja od ove ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

▼M8

60. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).

LITERATURA

1. OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

2. Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1.–36.

3. OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

4. Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457.–464.

5. Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925.–1930.

6. Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552.–2560.

7. Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71.–80.

8. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692.–1698.

9. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487.–1496.

10. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288.–295.

11. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78.–86.

12. Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11.–23.

13. U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupno na: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

14. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593.–599.

▼**M8**

15. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

16. Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69.–92.

17. Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

18. Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287.–1293.

19. Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley-Blackwell.

20. Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330.–338.

21. Poglavlje C.15. ovog Priloga, Test kratkotrajne toksičnosti na ribama u stadiju embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom.

22. Poglavlje C.37. ovog Priloga, 21-dnevni test na ribama: kratkoročni test probira na estrogensku i androgensku aktivnost i inhibiciju aromataze.

23. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.

24. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reprodukcijski test na ribama.

25. Poglavlje C.47. ovog Priloga, Ispitivanje toksičnosti na ribama u ranim životnim stadijima.

26. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.

27. Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067.–1076.

28. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301.–308.

29. OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

30. Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245.–251.

31. Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613.–619.

32. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.

33. Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108.–1116.

▼**M8**

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Potencijalna plodnost = broj jajašaca.

Stvarna plodnost = broj živih jajašaca/potencijalna plodnost.

Vilična dužina (FL) odnosi se na dužinu od vrha usta do kraja srednjih šipčica repne peraje i primjenjuje se na ribe kod kojih je teško odrediti gdje završava kralježnica (www.fishbase.org).

Valjivost = mladunci/broj embrija kojima se inkubator napuni.

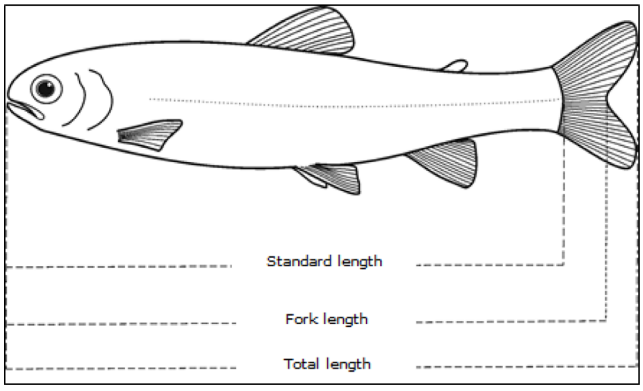
IACUC: institucionalni odbor za dobrobit i upotrebu životinja (engl. *Institutional Animal Care and Use Committee*).

Standardna dužina (SL) odnosi se na dužinu ribe izmjerenu od vrha usta do stražnjeg kraja zadnjeg kralješka ili do stražnjeg kraja srednjeg bočnog dijela hipuralne ploče. Jednostavnije rečeno, pri mjerenju se isključuje dužina repne peraje (www.fishbase.org).

Ukupna dužina (TL) odnosi se na dužinu od vrha usta do vrha dužeg režnja repne peraje, obično mjereno na režnjevima stisnutima duž središnje linije. Mjeri se u ravnoj liniji, a ne uz krivulju tijela (www.fishbase.org).

Slika 1.

opis različitih dužina koje se primjenjuju.



ECx: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC50 je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

Protočno ispitivanje je ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

▼**M8**

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa ribe po volumenu vode.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti podrobno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodacima 5. i 6.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC50): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification.*

Broj riba u odnosu na prostor: broj riba po volumenu vode.

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

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

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

WPF: tjedana nakon oplodnje.

▼**M8**

Dodatak 2.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatak 3.

ISPITNI UVJETI ZA MEOGRT

1.	Preporučena vrsta	Japanska medaka (*Oryzias latipes*)
2.	Vrsta ispitivanja	Kontinuirano protočno
3.	Temperatura vode	Nominalna ispitna temperatura iznosi 25 °C. Srednja temperatura tijekom cijelog ispitivanja u svakom spremniku iznosi od 24 do 26 °C.
4.	Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar i ~ 150 lumena/m^2) (~ 150 lx).
5.	Fotoperiod	16 sati svjetla, osam sati tame
6.	Masa riba u odnosu na prostor	F0: dvije odrasle ribe po ponavljanju; F1: počinje se s najviše 20 jajašaca (embrija) po ponavljanju, smanjuje se na 12 embrija po ponavljanju pri valjenju i zatim dvije odrasle ribe (uzgojni par XX-XY) od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje za reprodukcijsku fazu
7.	Najmanji iskoristivi volumen ispitne komore	1,8 l (npr. ispitna komora veličine: 18 x 9 x 15 cm)
8.	Izmjene volumena ispitnih otopina	Najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do najviše 16 obnavljanja volumena dnevno (ili protok od 20 ml/min)
9.	Starost ispitnih organizama na početku	F0: > 12 tjedana nakon oplodnje, ali ne preporučuje se više od 16 tjedana nakon oplodnje
10.	Broj organizama po ponavljanju	F0: dvije ribe (par mužjaka i ženke); F1: najviše 20 riba (jajašaca) po ponavljanju (nastalih iz uzgojnih parova generacija F0 i F1).
11.	Broj tretiranja	Pet tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole
12.	Broj ponavljanja po tretiranju	Najmanje šest ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 12 ponavljanja za kontrolu i za kontrolu s otapalom, ako se upotrebljava (broj ponavljanja udvostručuje se u reprodukcijskoj fazi generacije F1)
13.	Broj organizama po ispitivanju	Najmanje 84 ribe u generaciji F0 i 504 u generaciji F1 (ako se koristi kontrola s otapalom, 108 riba u generaciji F0 i 648 riba u generaciji F1). Jedinica koja se broji jest posteleutero-embrij.
14.	Režim hranjenja	Ribe se hrane *ad libitum* račićima *Artemia* spp. (ličinke stare 24 sata), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima (primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju odgovarajući rast i razvoj kojim se podupire pouzdana reprodukcija nalazi se u Dodatku 5.).

▼**M8**

15. Dozračivanje	Bez dozračivanja, osim ako se koncentracija otopljenog kisika približi vrijednosti < 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom
16. Voda za razrjeđivanje	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor.
17. Razdoblje izlaganja	U prvom redu 19 tjedana (od generacije F0 do valjenja generacije F2)
18. Biološke krajnje točke (primarne)	Valjivost (F1 i F2); preživljavanje (F1, od valjenja do 4. tjedna nakon oplodnje (kraj razdoblja ličinki/početak razdoblja juvenilnih riba), od 4. do 9. (ili 10.) tjedna nakon oplodnje (od početka razdoblja juvenilnih riba do riba koje nisu odrasle) i od 9. do 15. tjedna nakon oplodnje (od razdoblja riba koje nisu odrasle do usmrćivanja odraslih riba)); rast (F1, dužina i masa 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); sekundarna spolna obilježja (F1, papile na podrepnoj peraji 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); vitelogenin (F1, *vtg* mRNA ili protein VTG 15. tjedna nakon oplodnje); fenotipski spol (F1, gonadnom histologijom 15. tjedna nakon oplodnje); reprodukcija (F0 i F1, potencijalna i stvarna plodnost za 21 dan); vrijeme mriješćenja (F1) i histopatologija (F1, gonade, jetra i bubreg 15. tjedna nakon oplodnje)
19. Kriteriji valjanosti ispitivanja	Otopljeni kisik trebao bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C tijekom cijelog ispitivanja; uspješna reprodukcija ≥ 65 % ženki u kontrolama; srednja dnevna potencijalna plodnost ≥ 20 jajašaca u kontrolama; valjivost ≥ 80 % (prosjek) u kontrolama (i u generaciji F1 i F2); preživljavanje nakon valjenja do 3. tjedna nakon oplodnje ≥ 80 % (prosjek) i od 3. tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju ≥ 90 % (prosjek) u kontrolama (F1), koncentracije ispitivane kemikalije u otopini trebalo bi uspješno održavati u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

▼M8

Dodatak 4.

SMJERNICE ZA TIPIČNE KONTROLNE VRIJEDNOSTI

Treba napomenuti da se te kontrolne vrijednosti temelje na ograničenom broju validacijskih studija i podliježu izmjeni u kontekstu stjecanja novog iskustva.

Rast

Masa i dužina mjere se kod svih riba koje se uzorkuju devet (ili deset) i 15 tjedana nakon oplodnje. Ako se slijedi ovaj protokol, očekuje se da će se devetog tjedna nakon oplodnje dobiti mokra masa od 85 do 145 mg za mužjake i od 95 do 150 mg za ženke. Očekuje se da će se 15. tjedna nakon oplodnje dobiti masa od 250 do 330 mg za mužjake i od 280 do 350 mg za ženke. Iako su moguća znatna odstupanja od tih raspona za pojedinačne ribe, srednje kontrolne mase koje su znatno izvan tih raspona, a osobito manje, ukazuju na poteškoće s hranjenjem, kontrolom temperature, kakvoćom vode, bolešću ili bilo kojom kombinacijom tih čimbenika.

Valjenje

Uspješnost valjenja u kontrolama obično iznosi približno 90 %, ali nisu neuobičajene ni niže vrijednosti od približno 80 %. Uspješnost valjenja manja od 75 % može ukazivati na nedovoljno protresanje jajašaca koja se razvijaju ili nedovoljan oprez pri postupanju s jajašcima, na primjer nepravovremeno uklanjanje mrtvih jajašaca koje je dovelo do gljivične infekcije.

Preživljavanje

Stope preživljavanja do tri tjedna nakon oplodnje od valjenja i nakon tri tjedna nakon oplodnje obično iznose 90 % ili više za kontrole, ali ni niže stope preživljavanja od približno 80 % u ranim fazama života u kontrolama nisu razlog za zabrinutost. Stope preživljavanja u kontrolama manje od 80 % razlog su za zabrinutost i mogu ukazivati na nedovoljno čišćenje akvarija koje je dovelo do gubitka ličinki zbog bolesti ili gušenja do kojeg je došlo zbog niskih razina otopljenog kisika. Smrtnost može biti i posljedica ozljeda tijekom čišćenja spremnika i gubitka ličinki zbog odvodnog sustava spremnika.

Gen za vitelogenin

Iako se apsolutne razine ekspresije gena za *vitelogenin* (*vtg*) izražene kao kopije/ng ukupnog mRNA mogu znatno razlikovati među laboratorijima zbog postupaka ili instrumenata koji se koriste, omjer za *vtg* trebao bi biti približno 200 puta veći kod kontrolnih ženki nego kod kontrolnih mužjaka. Nije neuobičajeno da se taj omjer kreće čak i u rasponu od 1 000 do 2 000, ali omjeri manji od 200 sumnjivi su i mogu ukazivati na poteškoće s kontaminacijom uzorka ili poteškoće s korištenim postupcima i/ili reagensima.

Sekundarna spolna obilježja

Kod mužjaka normalni raspon sekundarnih spolnih obilježja, koja se definiraju kao ukupan broj segmenata u šipčicama peraje papila na podrepnoj peraji, iznosi od 40 do 80 segmenata od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje. Do 15. tjedna nakon oplodnje raspon za kontrolne mužjake treba biti od približno 80 do 120, a 0 za kontrolne ženke. Iz neobjašnjenih razloga u rijetkim slučajevima neki mužjaci ne razviju papile do 9. tjedna nakon oplodnje, ali budući da svi kontrolni mužjaci razvijaju papile do 15. tjedna nakon oplodnje, uzrok je vjerojatno zakašnjeli razvoj. Prisutnost papila kod kontrolnih ženki ukazuje na prisutnost mužjaka XX u populaciji.

▼**M8**

Mužjaci XX

Čini se da je normalna osnovna učestalost pojave mužjaka XX u kulturi približno 4 % ili manje na temperaturi od 25 °C, a učestalost se povećava s povećanjem temperature. Treba poduzeti korake za smanjenje udjela mužjaka XX u populaciji. Budući da se čini da učestalost pojave mužjaka XX ima genetsku komponentu te je stoga nasljedna, praćenje matične kulture i osiguravanje da se mužjaci XX ne upotrebljavaju za razmnožavanje matične kulture učinkovit je način smanjenja učestalosti pojave mužjaka XX u populaciji.

Aktivnost mriješćenja

Aktivnost mriješćenja u kontrolnim ponavljanjima treba svakodnevno pratiti prije ocjenjivanja potencijalne plodnosti. Kontrolni parovi mogu se kvalitativno ocijeniti kako bi se dokazala aktivnost mriješćenja. Većina kontrolnih parova trebala bi se mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Ako se do tog trenutka mrijesti malen broj parova, to ukazuje na moguće poteškoće sa zdravljem, zrelošću ili dobrobiti riba.

Potencijalna plodnost

Zdrave medake koje se dobro hrane trebale bi se svakodnevno mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje, pri čemu bi trebale proizvoditi od 15 do 50 jajašaca dnevno. Proizvodnja jajašaca za 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno i može iznositi čak i 40 jajašaca dnevno. Manji broj jajašaca može ukazivati na nezrele, pothranjene ili nezdrave parove koji se mrijeste.

Plodnost

Postotak plodnih jajašaca za kontrolne parove koji se mrijeste obično je u rasponu od 90 %, a nisu neuobičajene ni veće vrijednosti. Stope plodnosti manje od 80 % za kontrolna jajašca sumnjive su i mogu ukazivati na jedinke koje nisu zdrave ili na uvjete uzgoja kulture koji nisu idealni.

▼M8

Dodatak 5.

PRIMJER REŽIMA HRANJENJA

Primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju primjereni rast i razvoj za potporu pouzdanoj reprodukciji prikazan je u Tablici 1. Odstupanja od tog režima hranjenja mogu biti prihvatljiva, ali preporučuje se da ih se ispita kako bi se potvrdilo da dolazi do prihvatljivog rasta i reprodukcije. Kako bi se slijedio predloženi režim hranjenja, prije početka ispitivanja treba utvrditi suhu masu račića Artemia po volumenu tekuće kaše račića. To se može napraviti vaganjem utvrđenog volumena tekuće kaše račića koja se sušila 24 sata na 60 °C na unaprijed odvaganim pliticama. Kako bi se uzela u obzir masa soli u tekućoj kaši, identičan volumen iste otopine soli koja se upotrebljava u tekućoj kaši treba sušiti, vagati i oduzeti od mase osušene kaše račića. Umjesto toga račići se mogu filtrirati i isprati destiliranom vodom prije sušenja, čime se uklanja potreba za mjerenjem mase same soli. Te se informacije upotrebljavaju za pretvaranje informacija iz tablice za suhu masu račića Artemia u volumen tekuće kaše račića koji se daje ribama. Osim toga, preporučuje se da se alikvoti tekuće kaše račića važu svakog tjedna kako bi se potvrdila točna suha masa račića koji se daju kao hrana.

Tablica 1.

Primjer režima hranjenja

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići Artemia (mg suhe mase po ribi dnevno)
Dan 1.	0,5
Dan 2.	0,5
Dan 3.	0,6
Dan 4.	0,7
Dan 5.	0,8
Dan 6.	1,0
Dan 7.	1,3
Dan 8.	1,7
Dan 9.	2,2
Dan 10.	2,8
Dan 11.	3,5
Dan 12.	4,2
Dan 13.	4,5
Dan 14.	4,8
Dan 15.	5,2
Dani 16.–21.	5,6

▼**M8**

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići Artemia (mg suhe mase po ribi dnevno)
Četvrti tjedan	7,7
Peti tjedan	9,0
Šesti tjedan	11,0
Sedmi tjedan	13,5
Osmi tjedan – usmrćivanje	22,5

▼**M8**

Dodatak 6.

PRIMJER KOMORE ZA INKUBACIJU JAJAŠACA

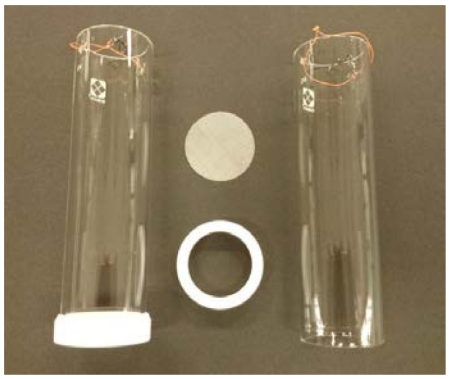
Primjer A





Ovaj se inkubator sastoji od prerezane staklene cijevi centrifuge povezane rukavom od nehrđajućeg čelika, koju drži navojni čep centrifuge. Kroz čep viri malena cijev od stakla ili nehrđajućeg čelika koja je postavljena u blizini zaobljenog dna; ona dovodi mjehuriće zraka kojima se suspendiraju jajašca i smanjuje prijenos saprofitnih gljivičnih infekcija među jajašcima uz istovremeno olakšavanje razmjene kemikalija između inkubatora i spremnika.

Primjer B



▼**M8**



Ovaj inkubator sastoji se od staklene cilindrične osnove (promjer od 5 cm i visina od 10 cm) i nehrđajuće žičane mreže (0,25 φ i mrežice 32) koja se pričvršćuje na dno osnove PTFE prstenom. Inkubatori se mogu suspendirati na šipkama za podizanje u spremnicima i vertikalno protresati (amplituda od približno pet centimetara) u ciklusu (približno jednom svake četiri sekunde) koji je primjeren za jajašca medake.

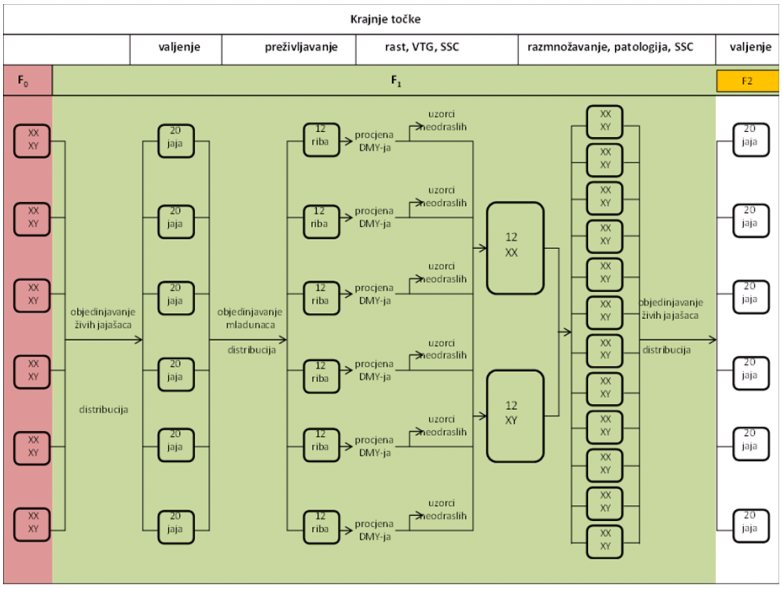
▼M8

Dodatak 7.

SHEMATSKI PRIKAZ ZA OBJEDINJAVANJE I POPUNJAVANJE PONAVLJANJA TIJEKOM CIJELE ISPITNE METODE MEOGRT

Slika 1.

Objedinjavanje i ponovno popunjavanje ponavljanja tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT. Slika predstavlja jedno tretiranje ili polovinu kontrole. Zbog objedinjavanja identitet ponavljanja nije kontinuiran tijekom cijelog ispitivanja. Napominje se da se izraz „jajašca" odnosi na živa, oplođena jajašca (ekvivalentno embrijima)



Tretiranja i ponavljanje

Za ispitnu metodu preporučuje se pet tretiranja ispitivanom kemikalijom upotrebom materijala tehničkog stupnja čistoće i negativne kontrole. Broj ponavljanja po tretiranju nije isti tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT te je broj ponavljanja u kontrolnom tretiranju dvostruko veći od bilo kojeg pojedinačnog tretiranja ispitivanom kemikalijom. Kod generacije F0 svako tretiranje ispitivanom kemikalijom ima šest ponavljanja, dok tretiranje negativnom kontrolom ima 12 ponavljanja. Ne preporučuje se upotreba otapala, a ako se ona upotrebljavaju, u izvješću o ispitivanju MEOGRT treba obrazložiti i zašto je otapalo potrebno i odabir specifičnog otapala. Isto tako, ako se upotrebljava otapalo, potrebne su dvije vrste kontrola: a) kontrola s otapalom i b) negativna kontrola. Te dvije kontrolne skupine trebale bi se sastojati od cijelog skupa ponavljanja u svim točkama vremenskog okvira ispitivanja MEOGRT. Ta struktura ponavljanja ostaje ista tijekom cijelog razvoja organizama iz generacije F1 (i F2 do valjenja). Međutim, u fazi odraslih riba, kada se uspostave uzgojni parovi generacije F1, optimalno je da se broj ponavljanja parova za reprodukciju po tretiranju udvostruči; stoga u svakom tretiranju ispitivanom kemikalijom ima do 12 parova ponavljanja, a u kontrolnoj skupini 24 para ponavljanja (i po potrebi još 24 para ponavljanja u kontroli s otapalom). Utvrđivanje valjenja i embrija koje su izmrijestili parovi generacije F1 obavlja se prema istoj strukturi ponavljanja kao i za embrije koje su izmrijestili parovi generacije F0, što podrazumijeva prvo šest ponavljanja po tretiranju ispitivanom kemikalijom i 12 ponavljanja u kontrolnim skupinama.

▼**M8**

Dodatak 8.

BROJANJE PAPILA NA PODREPNOJ PERAJI

Glavni materijali i reagensi

— Disekcijski mikroskop (s pričvršćenom kamerom koja nije obvezna)

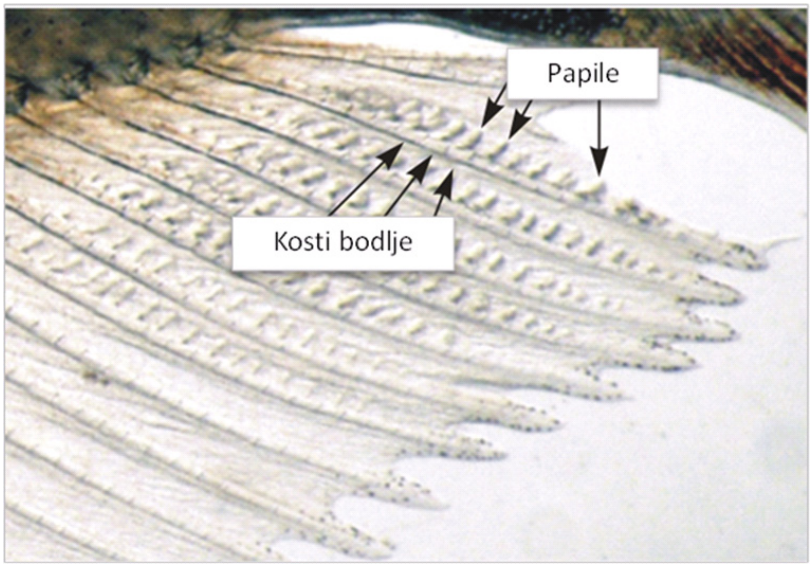
— Fiksativ (npr. Davidsonov fiksativ (ne preporučuje se Bouinov fiksativ)), ako se ne broji sa slike

Postupci

Nakon nekropsije treba slikati podrepnu peraju kako bi se omogućilo praktično brojanje papila na podrepnoj peraji. Iako je slikanje preporučena metoda, podrepna peraja može se fiksirati Davidsonovim fiksativom ili drugim odgovarajućim fiksativom približno jednu minutu. Važno je tijekom fiksacije držati podrepnu peraju ravnom kako bi se omogućilo lakše brojanje papila. Truplo s podrepnom perajom može se pohraniti u Davidsonovu fiksativu ili drugom odgovarajućem fiksativu do analize. Broji se broj kosti bodlje (vidjeti **sliku 1.**) s papilama koje vire na stražnjem dijelu kosti bodlje.

Slika 1.

Papile na podrepnoj peraji



▼M8

Dodatak 9.

PODROBAN VREMENSKI OKVIR ISPITIVANJA MEOGRT

1.–3. ispitni tjedan (F0)

Ribe iz generacije F0 koje se mrijeste i koje su ispunile kriterije za odabir (vidjeti stavke od 16. do 20.) izlažu se tri tjedna kako bi se omogućilo izlaganje gameta i gonadnih tkiva u razvoju ispitivanoj kemikaliji. U svaki se spremnik s ponavljanjem stavlja jedan uzgojni par riba (uzgojni par ženke XX i mužjaka XY). Izmriješćena jajašca prikupljaju se, broje i procjenjuje se njihova plodnost tijekom 21 uzastopnog dana, počevši od prvog ispitnog dana.

4. ispitni tjedan (F0 i F1)

Preporučuje se da se oplođena i živa jajašca (embriji) prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (na smrt oplođenih jajašaca može ukazivati, posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom; OECD 2010.).

Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru. Osim toga, moglo bi se dodati više uzgojnih parova po tretiranju i kontrolama u generaciji F0 kako bi se dobilo više jajašaca i dosegao preporučeni broj od 20 jajašaca po ponavljanju.

Uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju 24. ispitnog dana te se evidentiraju njihova masa i duljina. Uzgojni parovi generacije F0 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F1.

5.–6. ispitni tjedan (F1)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Budući da se embriji vale svakog dana, mladunci se objedinjuju prema tretiranju i sustavno raspodjeljuju u svaki spremnik s ponavljanjem za ličinke u okviru specifičnog tretiranja s najviše 12 mladunaca. To se obavlja nasumičnim odabirom mladunaca i stavljanjem pojedinačnih mladunaca u uzastopna ponavljanja neselektivnim izvlačenjem, krećući se redom kroz specifična ponavljanja tretiranja dok sva ponavljanja u okviru tretiranja ne budu imala 12 mladunaca. Ako nema dovoljno mladunaca da se popune sva ponavljanja, treba osigurati da što više ponavljanja ima 12 mladunaca da bi se započela faza F1.

Jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli smatraju se neodrživima te se odbacuju. Evidentira se broj mladunaca i računa se uspješnost valjenja (valjivost) u svakom ponavljanju.

▼M8

7.–11. ispitni tjedan (F1)

Preživljavanje ličinki riba svakodnevno se provjerava i evidentira u svim ponavljanjima. Evidentira se broj preživjelih riba u svakom ponavljanju 43. ispitnog dana te početni broj mladunaca koji su stavljeni u ponavljanje (najbolje dvanaest). To omogućuje izračun postotka preživljavanja od valjenja do faze riba koje nisu odrasle.

12. ispitni tjedan (F1)

Od 78. do 85. ispitnog dana uzima se mali uzorak s repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (tj. obrezivanje peraja) za sve ribe. Te se informacije koriste za utvrđivanje uzgojnih parova.

U roku od tri dana od utvrđivanja genotipskog spola svake ribe, nasumično se utvrđuje 12 uzgojnih parova po tretiranju i 24 para po kontroli. Dvije ribe XX i XY iz svakog ponavljanja nasumično se odabiru i objedinjuju prema spolu te se zatim nasumično odabiru za uspostavu uzgojnog para (tj. par XX-XY). Uspostavlja se najmanje 12 ponavljanja po tretiranju kemikalijom i najmanje 24 ponavljanja za kontrolu s jednim uzgojnim parom po ponavljanju. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY koje su dostupne za objedinjavanje, ribe s genotipom odgovarajućeg spola treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju.

Preostale ribe (najviše osam riba po ponavljanju) humano se usmrćuju i uzorkuju za različite krajnje točke riba koje nisu odrasle. Podaci o genu *dmy* (XX ili XY) za sve uzorke riba koje nisu odrasle zadržavaju se kako bi se osiguralo da se svi podaci o krajnjim točkama mogu povezati s genetskim spolom svake pojedinačne ribe.

13.–14. ispitni tjedan (F1)

Izlaganje se nastavlja kako se uzgojni parovi riba koje nisu odrasle razvijaju u odrasle ribe. Na 98. ispitni dan (tj. dan prije početka prikupljanja jajašaca) jajašca se uklanjaju i iz akvarija i sa ženki.

15.–17. ispitni tjedan (F1)

Izmriješćena jajašca prikupljaju se svakodnevno 21 uzastopan dan u svakom ponavljanju te se procjenjuju u pogledu potencijalne i stvarne plodnosti.

18. ispitni tjedan (ponavljanje 4. ispitnog tjedna) (F1 i F2)

Na 120. ispitni dan prikupljanje jajašaca obavlja se ujutro u svakom spremniku s ponavljanjem. Procjenjuju se prikupljena jajašca te se oplođena jajašca (uklonjeni filamenti) od svakog uzgojnog para objedinjuju prema tretiranju i sustavno distribuiraju u komore inkubatora jajašaca s 20 oplođenih jajašaca po inkubatoru. Inkubatori se mogu staviti u posebne „spremnike inkubatora” uspostavljene za svako tretiranje ili u spremnik s ponavljanjem u kojem će se ličinke držati nakon valjenja. Preporučuje se da se embriji prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema

▼M8

dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru.

Na 121. ispitni dan (ili 122. ispitni dan, kako bi se osiguralo da se generacija F2 dobro započne) uzgojni parovi generacije F1 humano se usmrćuju i analiziraju u pogledu krajnjih točaka odraslih riba. Uzgojni parovi generacije F1 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F2.

19.–20. ispitni tjedan (F2)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Ako ispitivanje završi dovršetkom valjenja generacije F2, mladunci se evidentiraju i odbacuju (embriji koji se ne izvale nakon produljenog vremena inkubacije, koje se definira kao razdoblje dvostruko dulje od srednjeg dana valjenja u kontroli, smatraju se neodrživima).

▼M8

Dodatak 10.

STATISTIČKA ANALIZA

Vrste bioloških podataka koji nastanu u ispitivanju MEOGRT nisu jedinstveni za to ispitivanje i, osim za patološke podatke, razvijene su mnoge primjerene statističke metodologije za pravilnu analizu sličnih podataka ovisno o značajkama podataka, među ostalim, normalnosti, homogenosti varijance, omogućuje li plan studije ispitivanje hipoteza ili regresijsku analizu, parametrijska ispitivanja u odnosu na neparametrijska itd. Općenito, u predloženim statističkim metodama poštuju se preporuke OECD-a za podatke o ekotoksičnosti (OECD, 2006.), a na slici 2. može se vidjeti grafikon odluke za analizu podataka dobivenih ispitivanjem MEOGRT.

Pretpostavlja se da će skupovi podataka najčešće pokazivati monotonične odgovore. Osim toga, treba razmotriti pitanje upotrebe jednosmjernog statističkog testiranja ili dvosmjernog statističkog testiranja. Predlaže se upotreba jednosmjernih statističkih testiranja osim ako postoji biološki razlog zbog kojeg ono ne bi bilo primjereno. Iako se u sljedećem odjeljku predlažu određeni statistički testovi, ako se razviju primjerenije i/ili snažnije statističke metode za primjenu na specifičnim podacima koji se dobiju ispitivanjem MEOGRT, upotrebljavali bi se ti statistički testovi kako bi se iskoristile te prednosti.

Podatke dobivene ispitivanjem MEOGRT treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol. Postoje dvije strategije za analizu podataka o ribama s promijenjenim spolom (mužjaci XX ili ženke XY): 1) isključivanje svih podataka o ribama s promijenjenim spolom iz cijelog ispitivanja, osim učestalosti pojave promjene spola u svakom ponavljanju; 2) zadržavanje podataka o svim ribama s promijenjenim spolom u skupu podataka i analiza na temelju genotipa.

Histopatološki podaci

Histopatološki podaci navode se kao ocjene ozbiljnosti koje se procjenjuju upotrebom novog statističkog postupka – RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*), (Green i dr., 2014.). U prilagodbama *Rao-Scottova* postupka zadržavaju se informacije iz ponavljanja ispitivanja; postupak *u dijelovima* (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ocjene ozbiljnosti obično povećavaju s povećanjem koncentracija u tretiranjima. Za svaku se dijagnozu u ishodu RSCABS-a navodi kod kojih se tretiranja javlja veća učestalost pojave patologije nego u kontrolama te povezane razine ozbiljnosti.

Podaci o potencijalnoj plodnosti

Analize za podatke o potencijalnoj plodnosti sastoje se od Jonckheere-Terpstraova ili Williamsova testa postupnog snižavanja kako bi se utvrdili učinci tretiranja, pod uvjetom da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju. Kod testa postupnog snižavanja sve se usporedbe obavljaju pri razini značajnosti od 0,05 i nema prilagodbi za broj usporedbi. Očekuje se da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, ali to se može provjeriti vizualnim pregledom podataka ili izradom linearnih i kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti tretiranja nakon transformacije podataka u redoslijed rangova. Test trenda dovršen je osim ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan. U suprotnom se obavlja Dunnettov test kako bi se utvrdili učinci tretiranja ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama. Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, upotrebljava se Dunnov test s Bonferonni-Holmovom prilagodbom. Svi navedeni testovi obavljaju se neovisno o bilo kakvom općem F-testu ili Kruskal-Wallisovu testu. Dodatne pojedinosti nalaze se u OECD-ovoj publikaciji iz 2006.

▼M8

Mogu se koristiti i alternativne metode, kao što su općeniti linearni model s Poissonovim pogreškama za brojeve jajašaca (bez transformacije), ako se to statistički obrazloži (Cameron i Trividi, 2013.). Ako se upotrebljava alternativni pristup, preporučuje se statističko savjetovanje.

Dnevni broj jajašaca u jednoj generaciji

Model ANOVA računa se kao Y = Vrijeme * Vrijeme + Tretiranje + * Tretiranje + Vrijeme * Tretiranje + * Vrijeme * Tretiranje, s nasumičnim učincima ponavljanja (Generacija * Tretiranje) i Vrijeme * Ponavljanje (Tretiranje), pri čemu se dopuštaju nejednake komponente varijance oba tipa kroz generacije. Vrijeme se ovdje odnosi na učestalost brojenja jajašaca (npr. dan ili tjedan). Ovo je analiza ponovljenog mjerenja, s korelacijama između opažanja na istim ponavljanjima kojima se uzima u obzir priroda ponovljenih mjerenja podataka.

Glavni učinci tretiranja ispituju se upotrebom Dunnettova (ili Dunnett-Hsuova) testa, kojim se prilagođava broj usporedbi. Potrebne su prilagodbe za glavni učinak generacije ili vremena jer za ta dva čimbenika ne postoji razina „kontrole” i svaki je par razina usporedba od mogućeg interesa. U slučaju tih dvaju glavnih učinaka, ako je F-test za glavni učinak značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima među razinama tog čimbenika zatim se mogu ispitati na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Model uključuje interakcije s dva i tri čimbenika, tako da glavni učinak za, na primjer, vrijeme, ne može biti značajan iako vrijeme znatno utječe na rezultate. Stoga, ako je interakcija s dva ili tri čimbenika koja uključuje vrijeme značajna na razini od 0,05, mogu se prihvatiti usporedbe razina vremena na razini značajnosti od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Zatim slijede F-testovi za značajnost tretiranja u vremenu, takozvani dijelovi u tablici ANOVA. Ako je, na primjer, dio za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 mogu se prihvatiti na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe. Slične izjave primjenjuju se na testove za vrijeme u generaciji F1 i tretiranju te za generaciju u okviru vremena i tretiranja.

Naposljetku, u slučaju usporedbi koje ne pripadaju nijednoj od prethodno navedenih kategorija, usporedbe treba prilagoditi upotrebom Bonferonni-Holmove prilagodbe p-vrijednostima. Daljnje informacije o analizama tih modela mogu se pronaći u Hocking (1985.) te Hochberg i Tamhane (1987.).

Umjesto toga, neobrađeni podaci evidentiraju se i prikazuju u izvješću o studiji kao potencijalna plodnost (broj jajašaca) po ponavljanju za svaki dan. Treba izračunati srednju vrijednost ponavljanja iz neobrađenih podataka i zatim primijeniti drugi korijen transformacija. Treba izračunati jednosmjernu ANOVA-u na transformiranim srednjim vrijednostima ponavljanja, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti. Može biti korisno i vizualno pregledati podatke o potencijalnoj plodnosti svakog tretiranja i/ili ponavljanja s pomoću dijagrama raspršenosti na kojem se prikazuju podaci kroz vrijeme. Time će se omogućiti neformalna procjena potencijalnih učinaka kroz vrijeme.

Svi ostali biološki podaci

Statističke analize temelje se na temeljnoj pretpostavci da će podaci biti monotonični ako je doza pravilno odabrana. Stoga se pretpostavlja da su podaci monotonični te se oni formalno procjenjuju u pogledu monotoničnosti upotrebom linearnih i kvadratnih kontrasta. Ako su podaci monotonični, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov test trenda na srednjim vrijednostima ponavljanja (kako se savjetuje u publikaciji OECD-a iz 2006.). Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije, smatra se da podaci nisu monotonični.

▼M8

Ako podaci nisu monotonični, osobito zbog smanjenog odgovora najvišeg tretiranja ili prva dva najviša tretiranja, treba razmotriti isključivanje tih tretiranja iz skupa podataka za analizu. Za tu odluku potrebna je stručna prosudba i svi dostupni podaci, posebno podaci koji ukazuju na očitu toksičnost na tim razinama tretiranja.

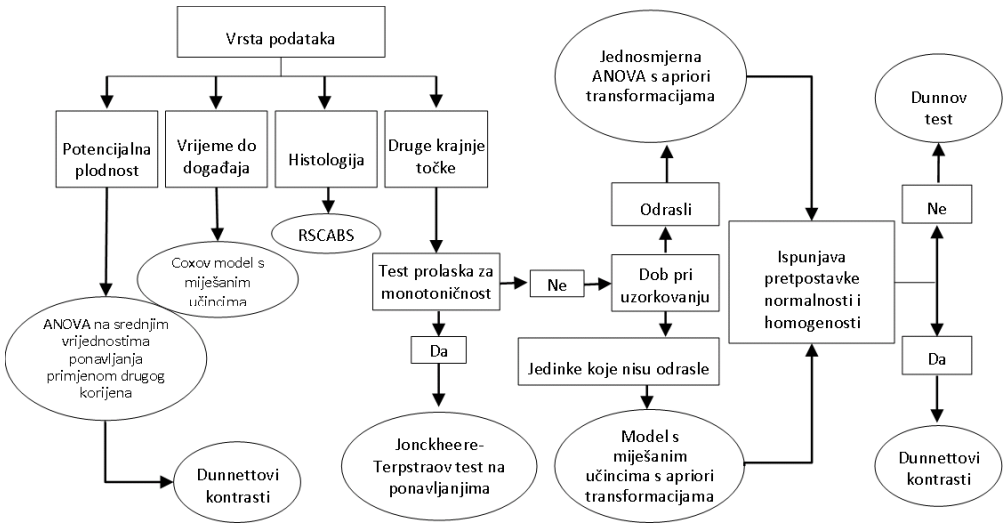
Za masu i dužinu ne preporučuju se nikakve prilagodbe, iako ponekad mogu biti potrebne. Međutim, za podatke o vitelogeninu preporučuje se log transformacija; za podatke o SSC-u preporučuje se log transformacija (papile na podrepnoj peraji); za podatke o udjelu valjenja, postotku preživljavanja, omjeru spolova i postotku plodnih jajašaca preporučuje se transformacija arkus sinusa drugog korijena. Vrijeme do valjenja i vrijeme do prvog mriješćenja treba tretirati kao podatke o vremenu do događaja, pri čemu se pojedinačni embriji koji se ne izvale u utvrđenom razdoblju ili ponavljanja u kojima ne dođe do mriješćenja tretiraju kao podaci koji se cenzuriraju desno. Vrijeme do valjenja treba računati od srednjeg dana valjenja svakog ponavljanja. Te krajnje točke treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima.

Biološki podaci uzoraka odraslih riba imaju jedno mjerenje po ponavljanju, odnosno postoji jedna riba XX i jedna riba XY po akvariju s ponavljanjem. Stoga se preporučuje da se na srednjim vrijednostima ponavljanja provede jednosmjerna ANOVA. Ako se ispune pretpostavke ANOVA-e (normalnost i homogenost varijanci, kako su procijenjeni na rezidualima ANOVA-e Shapiro-Wilksovim odnosno Leveneovim testom), treba upotrijebiti Dunnettove kontraste kako bi se utvrdila tretiranja koja su različita od kontrole. S druge strane, ako se ne ispune pretpostavke ANOVA-e, treba provesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole. Sličan se postupak preporučuje za podatke koji su u obliku postotaka (plodnost, valjenje i preživljavanje).

Biološki podaci uzoraka riba koje nisu odrasle imaju od jednog do osam mjerenja po ponavljanju, odnosno može postojati različit broj jedinki koje pridonose srednjoj vrijednosti ponavljanja za svaki genotipski spol. Stoga se preporučuje upotreba modela ANOVA s miješanim učincima, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti ako su ispunjene pretpostavke normalnosti i homogenosti varijanci (na rezidualima ANOVA-e s miješanim učincima). Ako one nisu ispunjene, treba provesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole.

Slika 2.

Dijagram toka za preporučene statističke postupke za analizu podataka u ispitivanju MEOGRT



▼**M8**

LITERATURA

1. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.

2. Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

3. Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/ Cole.

4. Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. TEST RASTA I RAZVOJA VODOZEMACA U FAZI LIČINKI (LAGDA)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 241 (2015.). Potreba za razvojem i validacijom testa kojim se mogu identificirati i opisati štetne posljedice izlaganja toksičnim kemikalijama u vodozemaca pojavila se zbog zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu štetno utjecati i na ljude i na životinje. U Smjernici OECD-a za ispitivanje pod nazivom Test rasta i razvoja vodozemaca u fazi ličinki (LAGDA, engl. *Larval Amphibian Growth and Development Assay*) opisuje se toksikološko ispitivanje s vrstom vodozemaca u kojem se razmatraju rast i razvoj od oplodnje i tijekom ranog juvenilnog razdoblja. To je test (obično 16 tjedana) u kojem se procjenjuju rani razvoj, metamorfoza, preživljavanje, rast i djelomično reproduktivno sazrijevanje. U njemu se omogućuje i mjerenje skupa drugih krajnjih točaka koje omogućuju dijagnostičku ocjenu kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne ili drugih vrsta razvojnih i reproduktivnih toksikanata. Metoda opisana u ovoj ispitnoj metodi izvedena je iz validacijske studije s afričkom pandžašicom (*Xenopus laevis*) koju je provela Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) uz popratni rad obavljen u Japanu (1.). Iako se druge vrste vodozemaca mogu prilagoditi protokolu testa rasta i razvoja, pri čemu je mogućnost utvrđivanja genetskog spola važna sastavnica, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na vrstu *Xenopus laevis*.

2. LAGDA služi kao ispitivanje više razine na vodozemcima za prikupljanje sveobuhvatnijih informacija o odnosu koncentracije i odgovora u pogledu štetnih učinaka, a primjereno je za identifikaciju i opis opasnosti te za procjenu rizika za okoliš. Test pripada četvrtoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija, na kojoj *in vivo* testovi pružaju i informacije o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke (2.). Opći plan izvođenja pokusa obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju prema Nieuwkoopu i Faberu (NF) (3.) najmanje četirima različitim koncentracijama ispitivane kemikalije (obično raspoređene barem u polulogaritamske intervale) i kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli, s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a (≤ 45 nakon oplodnje; obično približno 45 dana (dana nakon oplodnje). Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja (kod međuvremenog poduzorka i konačnog uzorka na kraju ispitivanja) uključuju točke koje ukazuju na opću toksičnost: smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. U metodi se najveća važnost pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i reproduktivni razvoj) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s x-postotnim učinkom (ECx) na krajnjoj točki koja se mjeri. Iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste kod kojih povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željenog ECx može biti nepraktično. Treba napomenuti i da metodom nije obuhvaćena sama reproduktivna faza. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa (osobito obnovljivost između više laboratorija za sada nije dokumentirana s eksperimentalnim podacima) predviđa se da će se Smjernica OECD-a za ispitivanje 241 revidirati i, prema

▼M8

potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. LAGDA je važan test za rasvjetljavanje čimbenika koji potencijalno pridonose smanjenju populacije vodozemaca procjenom učinaka izlaganja kemikalijama tijekom osjetljivog stadija ličinke, u kojem učinci na preživljavanje i razvoj, uključujući normalan razvoj reproduktivnih organa, mogu štetno utjecati na populacije.

4. Ispitivanje je osmišljeno za otkrivanje apikalnih učinaka koji su rezultat i endokrinih mehanizama i mehanizama koji nisu endokrini te uključuje dijagnostičke krajnje točke koje su djelomično specifične za ključne endokrine modalitete. Treba napomenuti da prije razvoja testa LAGDA nije postojao validirani test koji je služio toj svrsi za vodozemce.

5. Prije započinjanja testa važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije. Za test, koji traje približno 16 tjedana, potrebno je ukupno 480 životinja, tj. embrija vrste *X. laevis* (ili 640 embrija ako se upotrebljava kontrola s otapalom) kako bi se osigurala dovoljna snaga ispitivanja za ocjenu krajnjih točaka koje su relevantne za populaciju, kao što su rast, razvoj i reproduktivno sazrijevanje.

6. Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu. Nadalje, ovim se testom potencijalna plodnost ne ocjenjuje izravno pa možda neće biti primjenjiv za upotrebu na razini višoj od četvrte razine OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih tvari.

ZNANSTVENA OSNOVA ZA ISPITNU METODU

7. Velik dio trenutačnih spoznaja o biologiji vodozemaca dobiven je upotrebom ogledne laboratorijske vrste *X. laevis.* Ta se vrsta može rutinski uzgajati u laboratoriju, ovulacija se može inducirati upotrebom humanog korionskog gonadotropina (hCG) i zalihe životinja lako su dostupne kod komercijalnih uzgajivača.

8. Kao i kod svih kralježnjaka, razmnožavanje vodozemaca pod kontrolom je osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG) (4.). Estrogeni i androgeni posrednici su tog endokrinog sustava, koji određuju razvoj i fiziologiju spolno dimorfnih tkiva. U životnom ciklusu vodozemaca postoje tri posebne faze kada je ta os osobito aktivna: 1. gonadna diferencijacija tijekom razvoja ličinki, 2. razvoj sekundarnih spolnih obilježja i gonadno sazrijevanje tijekom juvenilne faze te 3. funkcionalno razmnožavanje odraslih jedinki. Sve te točke u razvoju vjerojatno su osjetljive na endokrine poremećaje koje uzrokuju određene kemikalije kao što su estrogeni i androgeni, što naposljetku dovodi do gubitka reproduktivne sposobnosti organizama.

9. Gonade se počinju razvijati u 43. stadiju NF-a, kada se prvo razvija bipotencijalni genitalni greben. Diferencijacija gonada počinje u 52. stadiju NF-a, kada primordijalne zametne stanice migriraju u medularno tkivo (mužjaci) ili

▼M8

ostaju u kortikalnoj regiji (ženke) gonada u razvoju (3.). Prvi je put navedeno da je taj proces spolne diferencijacije gonada osjetljiv na kemijske promjene kod roda *Xenopus* pedesetih godina 20. stoljeća (5. i 6.). Izlaganje punoglavaca estradiolu tijekom tog razdoblja diferencijacije gonada dovodi do promjene spola mužjaka koji postaju potpuno funkcionalne ženke kada dosegnu odraslu dob (7. i 8.). Moguća je i funkcionalna promjena spola ženki u mužjake i navedeno je da do nje dolazi nakon implantacije tkiva testisa kod punoglavaca (9.). Međutim, iako izlaganje inhibitoru aromataze uzrokuje funkcionalnu promjenu spola i kod vrste *X. tropicalis* (10.), nije dokazano da do toga dolazi i kod vrste *X. laevis*. U prijašnjim su se ispitivanjima učinci toksičnih tvari na gonadnu diferencijaciju procjenjivali histološkim ispitivanjem gonada pri metamorfozi i promjena spola mogla se utvrditi samo analizom omjera spolova. Donedavno nisu postojala sredstva za izravno utvrđivanje genetskog spola kod roda *Xenopus*. Međutim, nedavno su kod vrste *X. laevis* utvrđeni markeri povezani sa spolom, što omogućuje utvrđivanje genetskog spola i omogućuje izravnu identifikaciju životinja koje su promijenile spol (11.).

10. Razvoj mladih mužjaka nastavlja se s povećanjem razina testosterona u krvi koje odgovara razvoju sekundarnih spolnih obilježja te razvoju testisa. Kod ženki jajnici proizvode estradiol, što dovodi do pojave vitelogenina (VTG) u plazmi, vitelogenih jajnih stanica u jajniku i razvoja jajovoda (12.). Jajovodi su sekundarno spolno obilježje ženki koji djeluju u sazrijevanju jajnih stanica tijekom reprodukcije. Želatinozni omotači prianjaju uz vanjsku površinu jajnih stanica dok one prolaze kroz jajovod i sakupljaju se u vrećici s jajašcima te su spremne za oplodnju. Čini se da razvojem jajovoda upravljaju estrogeni jer je razvoj u korelaciji s razinama estradiola u krvi kod vrsta *X. laevis* (13.) i *X. tropicalis* (12.). Navedeno je da dolazi do razvoja jajovoda u mužjaka nakon izlaganja spojevima polikloriranih bifenila (14.) i 4-*tert*-oktilfenolu (15.).

NAČELO ISPITIVANJA

11. Plan ispitivanja obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju NF-a putem vode različitim koncentracijama ispitivane kemikalije te kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a. Iako je jako hidrofobne kemikalije moguće dozirati u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno. Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za svaku upotrijebljenu kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja uključuju one koje ukazuju na opću toksičnost (tj. smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa)) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače (tj. histopatologija štitnjače, histopatologija gonada i gonadnih kanala, abnormalan razvoj, vitelogenin u plazmi (neobavezno) i omjeri genotipskog/fenotipskog spola).

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

12. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:

— tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom,

▼**M8**

— temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C,

— pH-vrijednost ispitivane otopine treba održavati u rasponu od 6,5 do 8,5 i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5,

— trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,

— smrtnost tijekom razdoblja izlaganja treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju u kontrolama,

— vijabilnost ≥ 70 % u mrijestu koji je odabran za započinjanje studije,

— srednje vrijeme do 62. stadija NF-a kontrola treba biti ≤ 45 dana,

— srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti 1,0 ± 0,2 g u kontrolama i 11,5 ± 3 g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju).

13. Iako to nije kriterij valjanosti, preporučuje se da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Visoka smrtnost, koja kompromitira tretiranje, definira se kao > 4 smrtna slučaja (> 20 %) u dva ili više ponavljanja koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Za analizu bi trebale biti dostupne najmanje tri razine tretiranja bez jasnih znakova očite toksičnosti. Znakovi očite toksičnosti mogu uključivati, ali nisu ograničeni na, plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje, morfološke abnormalnosti (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije i abdominalne edeme.

14. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODA

Oprema

15. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

(a) uređaji za kontroliranje temperature (npr. grijači ili hladnjaci podesivi na 21 ± 1 °C);

▼M8

(b) termometar;

(c) binokularni disekcijski mikroskop i pribor za seciranje;

(d) digitalni fotoaparat s najmanje četiri megapiksela razlučivosti i mikrofunkcijom (ako je potrebno);

(e) analitička vaga s mogućnošću mjerenja do 0,001 mg ili 1 μg;

(f) mjerač otopljenog kisika i pH-vrijednosti;

(g) mjerač intenziteta svjetlosti s mogućnošću mjerenja u luksima.

Voda

Izvor i kvaliteta

16. Može se upotrebljavati bilo koja voda za razrjeđivanje koja je lokalno dostupna (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom) i omogućuje normalan rast i razvoj vrste *X. laevis* te trebaju biti dostupni dokazi o normalnom rastu u toj vodi. Budući da se kakvoća lokalne vode može znatno razlikovati od jednog do drugog područja, potrebno je provesti analizu kakvoće vode, pogotovo ako nisu dostupni prijašnji podaci o korisnosti vode za uzgoj ličinki vodozemaca. Mjerenje teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi prije početka ispitivanja i/ili npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2.

Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

17. Kako bi štitnjača sintetizirala hormone štitnjače i podržala normalnu metamorfozu, ličinkama treba biti dostupno dovoljno jodida koji se dobiva iz vode i hrane. Trenutačno ne postoje empirijski izvedene smjernice za najmanje koncentracije jodida u hrani ili vodi kojima se osigurava pravilan razvoj. Međutim, dostupnost jodida može utjecati na reakciju tiroidnog sustava na aktivna sredstva i poznato je da modulira bazalnu aktivnost štitnjače, što zaslužuje pozornost pri tumačenju rezultata histopatologije štitnjače. Na temelju prethodnog rada, uspješna provedba testa dokazana je kada je raspon koncentracija jodida (I^{-}) u vodi za razrjeđivanje od 0,5 do 10 μg/l. Idealno bi najmanja koncentracija jodida u vodi za razrjeđivanje tijekom cijelog ispitivanja trebala iznositi 0,5 μg/l (dodan u obliku natrijeve ili kalijeve soli). Ako se ispitna voda pomiješa s deioniziranom vodom, potrebno je dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 μg/l. Treba izvijestiti o izmjerenim koncentracijama jodida u ispitnoj vodi (tj. vodi za razrjeđivanje) i dodavanju joda ili drugih soli (ako se upotrebljavaju) ispitnoj vodi. Osim u ispitnoj vodi, udio joda može se mjeriti i u hrani.

Sustav izlaganja

18. Ispitivanje je razvijeno upotrebom protočnog sustava za razrjeđivanje. Sastavnice sustava koje dolaze u dodir s vodom trebale bi biti od stakla, nehrđajućeg čelika i/ili drugih kemijski inertnih materijala. Spremnici za izlaganje trebaju biti akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika, a iskoristivi volumen spremnika trebao bi biti od 4,0 do 10,0 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm). Sustav bi trebao moći podržati sve koncentracije u izlaganjima, kontrolu i kontrolu s otapalom, ako je potrebna, s četiri ponavljanja po tretiranju i osam ponavljanja u kontrolama. Brzina protoka za svaki spremnik trebala bi biti konstantna s obzirom na održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikaliji. Preporučuju se primjerene brzine protoka (npr. najmanje pet

▼M8

izmjena vode u spremniku dnevno) kako bi se izbjegla smanjenja koncentracije kemikalija zbog metabolizma ispitnih organizama i vodenih mikroorganizama prisutnih u akvariju ili abiotičkih načina razgradnje (hidroliza, fotoliza) ili gubitka (hlapljenje, sorpcija). Spremnicima za tretiranje treba nasumično dodijeliti položaj u sustavu izlaganja kako bi se izbjegli mogući učinci položaja, uključujući male razlike u temperaturi, intenzitetu svjetlosti itd. Daljnje informacije o uspostavi protočnih sustava izlaganja mogu se pronaći u Standardnom vodiču za provođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima s ribama, makrobeskralježnjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM) (16.).

Uvođenje kemikalije: priprema ispitnih otopina

19. Kako bi se pripremile ispitne otopine u sustavu izlaganja glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom ili drugim uređajima. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitnu otopinu u svakoj komori treba obnavljati primjenom najmanje pet obnavljanja volumena dnevno.

20. Metoda koja se upotrebljava za uvođenje ispitivane kemikalije u sustav može varirati ovisno o njezinim fizikalno-kemijskim svojstvima. Stoga prije ispitivanja treba dobiti početne informacije o kemikaliji koje su relevantne za utvrđivanje mogućnosti njezina ispitivanja. Korisne informacije o svojstvima koja su specifična za ispitivanu kemikaliju uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlu, pK_a i K_{ow}, topljivost u vodi (po mogućnosti u ispitnom mediju) i tlak pare te rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili C.29. (18.)). Topljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na temelju koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane kemikalije. Provedbu ovog ispitivanja bez prethodno navedenih informacija treba pozorno razmotriti jer će plan studije ovisiti o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i bez tih podataka rezultate ispitivanja možda će biti teško tumačiti ili neće imati smisla. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju ispitivane kemikalije u ispitnim otopinama s utvrđenom i dokumentiranom točnošću i granicom otkrivanja. Ispitivane kemikalije topljive u vodi mogu se otopiti u alikvotima vode za razrjeđivanje pri koncentraciji pri kojoj je moguća isporuka ciljane ispitivane koncentracije u protočnom sustavu. Za kemikalije koje su na sobnoj temperaturi u tekućem ili krutom stanju te su umjereno topljive u vodi možda će biti potrebno miješanje dviju tekućina do zasićenosti ili miješanje tekućine i krute tvari do zasićenosti (npr. kolona od staklene vune) (19.). Iako će možda biti moguće dozirati vrlo hidrofobne ispitivane kemikalije u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno.

21. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (20.). Prednost se daje upotrebi ispitnog sustava bez suotapala; međutim, različite ispitivane kemikalije sadržavat će različita fizikalno-kemijska svojstva koja će vjerojatno zahtijevati različite pristupe za pripremu vode za izlaganje kemikaliji. Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po

▼M8

sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma" povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima znatne posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (21.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih kontrolnih podataka o otapalu. Ako ne postoje prijašnji podaci, prije provedbe konačne studije treba utvrditi primjerenost otapala. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo nosač najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (21.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr.<20 µl/l) kako bi se izbjegli mogući učinci otapala na krajnje točke koje se mjere (22.).

Ispitne životinje

Ispitne vrste

22. Kao ispitna vrsta upotrebljava se *X. laevis* iz sljedećih razloga: 1. rutinski se uzgaja u laboratorijima diljem svijeta; 2. može se lako nabaviti kod komercijalnih dobavljača i 3. moguće je utvrditi genetski spol.

Njega i uzgoj odraslih životinja

23. Primjerena njega i uzgoj vrste *X. laevis* opisani su u standardiziranoj smjernici (23.). Držanje i njegu vrste *X. laevis* opisao je i Read (24.). Kako bi se induciralo razmnožavanje, odraslim ženkama i mužjacima koji čine od tri do pet parova intraperitonealno se ubrizgava humani korionski gonadotropin (hCG). Uzorcima ženki i mužjaka ubrizgava se npr. približno 800–1 000 IU odnosno 500–800 IU hCG-a otopljenog u fiziološkoj otopini od 0,6 do 0,9 % (ili Ringerovoj otopini za žabe, izotoničnoj otopini za upotrebu na vodozemcima). Volumeni koji se ubrizgavaju trebaju iznositi približno 10 µl/g tjelesne mase (~ 1 000 µl). Nakon toga inducirani uzgojni parovi drže se u velikim spremnicima, neometano i pod statičkim uvjetima radi poticanja ampleksusa (vanjske oplodnje). Dno svakog spremnika za parenje trebalo bi imati lažno dno s mrežom od nehrđajućeg čelika (npr. otvori od 1,25 cm), koja omogućava da jajašca padnu na dno spremnika. Žabe kojima je hCG ubrizgan u kasnim poslijepodnevnim satima obično će položiti većinu svojih jajašaca do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon izbacivanja i oplodnje dovoljne količine jajašaca potrebno je ukloniti odrasle životinje iz spremnika za uzgoj. Jajašca se zatim prikupljaju i želatinozni omotači uklanjaju se tretiranjem L-cisteinom (23.). Treba pripremiti 2-postotnu otopinu L-cisteina, a pH-vrijednost prilagoditi na 8,1 s 1 M NaOH. Ta otopina temperature od 21 °C dodaje se u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 ml koja sadržava jajašca iz jednog mrijesta te se lagano miješa jednu minutu ili dvije

▼M8

minute, a zatim temeljito ispire 6–8 puta vodom za uzgoj kulture temperature od 21 °C. Jajašca se zatim prenose u posude za kristalizaciju i utvrđuje se je li vijabilnost > 70 %, s minimalnim abnormalnostima kod embrija koji pokazuju diobu stanica.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

24. Preporučuje se upotreba najmanje četiriju koncentracija kemikalija i odgovarajućih kontrola (uključujući kontrole s otapalom, ako su potrebne). Općenito se preporučuje razmak između koncentracija (interval) koji nije veći od 3,2.

25. Za potrebe ovog ispitivanja treba upotrebljavati rezultate iz postojećih studija na vodozemcima u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se utvrdila najviša ispitna koncentracija i izbjegle koncentracije koje su očito toksične. Utvrđivanju te koncentracije mogu pridonijeti informacije iz, na primjer, kvantitativnih odnosa između strukture i aktivnosti, analogija i podaci iz postojećih studija s vodozemcima kao što su analiza metamorfoze vodozemaca, ispitna metoda C.38. (25.) i analiza teratogeneze embrija žabe – *Xenopus* (23.) i/ili ispitivanja na ribama kao što su ispitne metode C.48., C.41. i C.49. (26., 27. i 28.). Prije provedbe testa LAGDA može se provesti pokus za utvrđivanje raspona. Preporučuje se da se izlaganje za utvrđivanje raspona započne u roku od 24 sata od oplodnje i nastavi od sedam do 14 dana (po potrebi i dulje) te da se ispitne koncentracije utvrde tako da intervali između ispitnih koncentracija nisu veći od faktora 10. Rezultati pokusa za utvrđivanje raspona trebali bi služiti za utvrđivanje najviše ispitne koncentracije u testu LAGDA. Napominje se da se u slučajevima u kojima se mora upotrijebiti otapalo primjerenost otapala (tj. može li ono utjecati na ishod studije) može utvrditi kao dio studije za utvrđivanje raspona.

Ponavljanja unutar ispitnih skupina i kontrola

26. Treba upotrijebiti najmanje četiri spremnika s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji i najmanje osam ponavljanja za kontrole (i kontrole s otapalom ako su potrebne) (tj. broj ponavljanja u kontroli i kontroli s otapalom treba biti dvostruko veći od broja ponavljanja svake ispitne skupine kako bi se osigurala odgovarajuća statistička snaga). Svako ponavljanje treba sadržavati najviše 20 životinja. Minimalni broj životinja koje se tretiraju bio bi 15 (pet za uzorak u 62. stadiju NF-a i deset mladih životinja). Međutim, svakom se ponavljanju dodaju dodatne životinje kako bi se uzela u obzir mogućnost smrtnosti i održao kritični broj od 15 životinja.

POSTUPAK

Pregled testa

27. Test započinje tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se razvojem mladih životinja. Životinje se svakodnevno pregledavaju kako bi se uočila smrtnost i bilo kakav znak abnormalnog ponašanja. U 62. stadiju NF-a prikuplja se poduzorak ličinki (do pet životinja po ponavljanju) i ispituju se različite krajnje točke (tablica 1.). Nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a, tj. kraj metamorfoze (ili nakon 70 dana od započinjanja testa, ovisno o tome što je kraće), provodi se nasumično izdvajanje (ali bez uzimanja poduzoraka) kako bi se smanjio broj životinja (deset po

▼M8

spremniku) (vidjeti stavak 43.), a preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli. Na kraju ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja) obavljaju se dodatna mjerenja (tablica 1.).

Uvjeti izloženosti

28. Potpuni sažetak ispitnih parametara dostupan je u Dodatku 3. Tijekom razdoblja izlaganja svakodnevno treba mjeriti otopljeni kisik, temperaturu i pH-vrijednost ispitnih otopina. Vodljivost, lužnatost i tvrdoća mjere se jednom mjesečno. Za temperaturu vode ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja (u jednom danu) ne bi trebale biti veće od 1,0 °C. Isto tako, za pH-vrijednost ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5.

29. Nepojedena hrana i otpad mogu se svakodnevno uklanjati iz spremnika za izlaganje s pomoću sifona, pri čemu treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija među spremnicima. Treba se paziti da se smanje stres i traume za životinje, osobito tijekom kretanja, čišćenja akvarija i rukovanja. Potrebno je izbjegavati stresne uvjete/aktivnosti kao što su glasna i/ili neprekidna buka, tapkanje po akvariju, vibracije u akvariju.

Trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji

30. Izlaganje započinje s tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a (≤ 45 dana od početka testa) u kontrolnoj skupini. Test LAGDA obično traje 16 tjedana (najviše 17 tjedana).

Početak testa

31. Za roditeljske životinje koje su upotrebljavaju za početak testa prethodno se trebalo dokazati da daju potomke čiji se spol može genetski utvrditi (Dodatak 5.). Nakon mriješćenja odraslih životinja embriji se prikupljaju, tretiraju cisteinom kako bi se uklonio želatinozni omotač te se probiru u pogledu vijabilnosti (23.). Tretiranje cisteinom omogućuje da se embriji ne zalijepe za površinu dok se njima rukuje tijekom probira. Probir se obavlja disekcijskim mikroskopom tako da se neodrživi embriji uklone pipetom odgovarajuće veličine. Poželjno je da se za ispitivanje upotrijebi jedan mrijest čija je vijabilnost veća od 70 %. Embriji u 8.–10. stadiju NF-a nasumično se raspoređuju u spremnike za tretiranje izlaganjem koji sadržavaju odgovarajući volumen vode za razrjeđivanje sve dok svaki spremnik ne sadržava 20 embrija. Embrijima treba pažljivo rukovati tijekom ovog prijenosa kako bi se smanjio stres zbog rukovanja i kako bi se izbjegle ozljede. Punoglavci bi se trebali pomaknuti prema gore u vodenom stupcu i početi prianjati uz stijenke spremnika 96 sati nakon oplodnje.

Režim hranjenja

32. Promjena hrane i količine hrane tijekom različitih životnih faza vrste *X. laevis* vrlo su važan aspekt protokola za test LAGDA. Pretjerano hranjenje tijekom faze ličinki obično dovodi do učestalije pojave i težeg oblika skolioze (Dodatak 8.) te ga treba izbjegavati. Za razliku od toga, nedovoljno hranjenje tijekom faze ličinki dovodi do vrlo različitih stopa razvoja među kontrolama, što može ugroziti statističku snagu ili dovesti do zbunjujućih

▼M8

rezultata ispitivanja. U Dodatku 4. navodi se preporučena prehrana za ličinke i mlade životinje te režimi hranjenja za vrstu *X. laevis* u protočnim uvjetima, ali dopuštene su i alternative pod uvjetom da je osiguran pravilan rast i razvoj ispitnih organizama. Važno je napomenuti da ako se mjere krajnje točke koje su specifične za endokrini sustav, u hrani ne smije biti endokrinološki aktivnih tvari kao što je sojino brašno.

Hranjenje ličinki

33. Preporučena prehrana ličinki sastoji se od početne hrane za pastrve, tableta od algi *Spirulina* i pahuljica za zlatne ribice (npr. hrana u listićima Tetra-Fin®, Tetra, Njemačka) pomiješanih u vodi za uzgoj kulture (ili za razrjeđivanje). Ta se smjesa primjenjuje tri puta dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom. Punoglavci se hrane i živim ličinkama račića *Artemia* spp. starima 24 sata dvaput dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom, počevši osmog dana nakon oplodnje. Hranjenje ličinki, koje treba biti dosljedno u svim ispitnim posudama, treba omogućiti primjereni rast i razvoj ispitnih životinja kako bi se osigurale obnovljivost i prenosivost rezultata testa: 1. srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba biti ≤ 45 dana i 2. preporučuje se srednja masa u rasponu od 1,0 ± 0,2 g u 62. stadiju NF-a u kontrolama.

Hranjenje mladih životinja

34. Kada metamorfoza završi režim hranjenja sastoji se od vrhunske hrane za žabe koja tone, npr. *Sinking Frog Food -3/32* (Xenopus Express, FL, SAD) (Dodatak 4.). U ranoj fazi mladih žaba peleti se nakratko melju u mlincu za kavu, miješalici ili se gnječe tarionikom i tučkom kako bi se usitnili. Kada mlade žabe narastu dovoljno da bi konzumirale cijele pelete mljevenje ili gnječenje više nije potrebno. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Hranjenje mladih žaba treba omogućiti primjereni rast i razvoj organizama: preporučuje se srednja masa u rasponu od 11,5 ± 3 g kod kontrolnih mladih žaba na kraju testa.

Analitička kemija

35. Prije početka testa treba utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije (npr. topljivost, razgradivost i hlapljivost) i sve potrebne analitičke metode, npr. upotrebom postojećih informacija ili znanja. Kod doziranja u vodi za razrjeđivanje preporučuje se da se ispitne otopine iz svakog spremnika s ponavljanjem analiziraju prije početka ispitivanja kako bi se provjerilo funkcioniranje sustava. Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom razdoblja izlaganja, po mogućnosti svakog tjedna za najmanje jedno ponavljanje u svakoj ispitnoj skupini, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % nominalne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. Isto tako, koeficijent varijacije (CV) izmjerenih ispitnih koncentracija tijekom cijelog ispitnog razdoblja u tretiranju treba održavati na 20 % ili manje u svakoj koncentraciji. Ako izmjerene koncentracije ne ostanu u rasponu od 80 do 120 % nominalne koncentracije (na primjer, kod ispitivanja vrlo biorazgradivih ili adsorptivnih kemikalija), koncentracije s učinkom treba utvrditi i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije za protočna ispitivanja.

▼M8

36. Brzine protoka vode za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim intervalima (npr. tri puta tjedno) tijekom cijelog izlaganja. U slučaju kemikalija koje se ne mogu otkriti pri nekim ili svim nominalnim koncentracijama (npr. zbog brze razgradnje ili adsorpcije u ispitnim posudama ili vidne akumulacije kemikalije u tijelima izloženih životinja) preporučuje se da se stopa obnove ispitne otopine u svakoj komori prilagodi tako da se ispitne koncentracije održe što stabilnijima.

Opažanja i mjerenja krajnjih točaka

37. Tijekom izlaganja ocjenjuju se krajnje točke koje ukazuju na toksičnost, uključujući smrtnost, abnormalno ponašanje kao što su klinički znakovi bolesti i/ili opće toksičnosti te utvrđivanja rasta (duljine i mase) te patološke krajnje točke koje mogu reagirati i na opću toksičnost i na endokrine načine djelovanja koji su usmjereni na putove kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. Osim toga, po želji se na kraju testa može izmjeriti i koncentracija VTG-a u plazmi. Mjerenje VTG-a može biti korisno u razumijevanju rezultata studije u kontekstu endokrinih mehanizama kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne. Krajnje točke i vrijeme mjerenja sažeti su u tablici 1.

Tablica 1.

Pregled krajnjih točaka u ispitivanju LAGDA

Krajnje točke (*)	Svakodnevno	Uzorkovanje u međuvremenu (uzorkovanje ličinki)	Kraj ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja)
Smrtnost i abnormalnosti	X		
Vrijeme do 62. stadija NF-a		X	
Histo(pato)logija (štitnjača)		X	
Morfometrija (rast u pogledu mase i duljine)		X	X
Somatski indeks jetre (LSI)			X
Omjeri genetskog/fenotipskog spola			X
Histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, bubreg i jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobavezno)			X

(*) Sve krajnje točke statistički se analiziraju.

Smrtnost i svakodnevna opažanja

38. Sve ispitne spremnike potrebno je provjeriti svakodnevno radi mrtvih životinja i zabilježiti smrtne slučajeve za svaki spremnik. Mrtve životinje potrebno je ukloniti iz ispitnog spremnika čim se uoče. Razvojni stadij uginulih životinja treba razvrstati kao životinje prije 58. stadija NF-a (prije pojave udova), od 58. stadija NF-a do 62. stadija NF-a, od 63. stadija NF-a do 66. stadija NF-a (od 62. stadija NF-a do potpune resorpcije repa) ili nakon 66. stadija NF-a (nakon faze ličinke). Stope smrtnosti veće od 20 % mogu ukazivati na neprimjerene ispitne uvjete ili očito toksične učinke ispitivane kemikalije. Životinje su obično najosjetljivije na događaje

▼M8

sa smrtnim ishodom koji nisu inducirani kemikalijama tijekom prvih par dana razvoja nakon mriješćenja i tijekom metamorfoznog klimaksa. Takva smrtnost mogla bi biti očita iz kontrolnih podataka.

39. Osim toga, treba evidentirati sva neobična ponašanja, jako izražene malformacije (npr. skoliozu) ili lezije. Treba prebrojati slučajeve opažene skolioze (učestalost) i razvrstati s obzirom na ozbiljnost (npr. nije značajna – NR, minimalna – 1, umjerena – 2, teška – 3; Dodatak 8.). Treba nastojati osigurati da se ograniči učestalost pojave umjerene i teške skolioze (npr. manja od 10 % u kontrolama) tijekom cijele studije, iako veća učestalost pojave abnormalnosti u kontrolama ne bi nužno bila razlog za prekid ispitivanja. Normalno ponašanje za ličinke karakterizira lebdenje u vodenom stupcu s repom povišenim iznad glave, redovito i ritmičko udaranje repne peraje, redovito izranjanje na površinu, operkulacija i reagiranje na podražaje. Neuobičajena ponašanja uključivala bi npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje. Uz prethodno navedena abnormalna ponašanja, za životinje nakon metamorfoze treba evidentirati i velike razlike u unosu hrane među tretiranjima. Grube malformacije i lezije mogu na primjer uključivati morfološke anomalije (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije, abdominalne edeme te bakterijske ili gljivične infekcije. Pojave lezija na glavi mladih životinja, odmah iza nosnica, mogu biti znak nedovoljne vlažnosti. Ta su određivanja kvalitativna i potrebno ih je smatrati srodnim kliničkim znakovima bolesti/stresa i usporediti s kontrolnim životinjama. Ako je stopa učestalosti pojave veća u izloženim spremnicima nego u kontrolnima, tada ih je potrebno smatrati dokazom očite toksičnosti.

Poduzorkovanje ličinki

Okvir za poduzorkovanje ličinki

40. Punoglavce koji su dosegnuli 62. stadij NF-a treba ukloniti iz spremnika te uzorkovati ili prenijeti u sljedeći dio izlaganja u novom spremniku ili fizički odvojiti od preostalih punoglavaca u istom spremniku s pomoću pregrade. Punoglavci se svakodnevno pregledavaju i evidentira se dan studije na koji pojedinačni punoglavac dosegne 62. stadij NF-a. U ovoj se procjeni kao odlučujuća karakteristika upotrebljava oblik glave. Kada se glava smanji tako da je vizualno približno jednaka širini trupa i prednjih udova na razini sredine srca smatra se da je jedinka dosegnula 62. stadij NF-a.

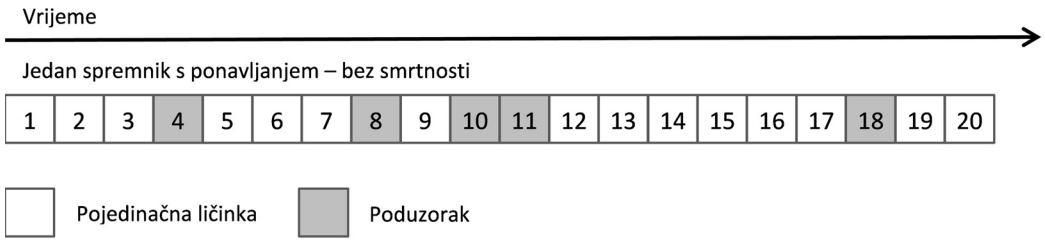
41. Cilj je uzorkovati ukupno pet punoglavaca u 62. stadiju NF-a po spremniku s ponavljanjem. To bi trebalo provesti potpuno nasumično, ali odluku treba donijeti *a priori*. Hipotetski primjer spremnika s ponavljanjem prikazan je na **slici 1**. Ako u određenom spremniku ima 20 živih punoglavaca kada prva jedinka dosegne 62. stadij NF-a, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–20. Punoglavac br. 1 prva je jedinka koja dosegne 62. stadij NF-a, a punoglavac br. 20 posljednja je jedinka u spremniku koja dosegne 62. stadij NF-a. Isto tako, ako u spremniku ima 18 živih ličinki, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–18. To treba obaviti za svaki spremnik s ponavljanjem kada prva jedinka u ispitivanju dosegne 62. stadij NF-a. Ako tijekom uzorkovanja u 62. stadiju NF-a postoje smrtni slučajevi, preostale uzorke treba ponovno nasumično odabrati na temelju broja preostalih ličinki koje nisu dosegnule 62. stadij NF-a i koliko je uzoraka još potrebno kako bi se dobilo ukupno pet uzoraka iz tog ponavljanja. Na dan na koji punoglavac dosegne 62. stadij NF-a, upućuje se na pripremljenu shemu uzorkovanja

▼**M8**

kako bi se utvrdilo hoće li se ta jedinka uzorkovati ili fizički odvojiti od ostalih punoglavaca radi daljnjeg izlaganja. U navedenom primjeru (slika 1.) prva jedinka koja je dosegnula 62. stadij NF-a (tj. okvir br. 1) fizički je odvojena od ostalih ličinki i nastavlja se izlagati te se evidentira dan studije na koji je jedinka dosegnula 62. stadij NF-a. Nakon toga jedinke br. 2 i 3 tretiraju se na isti način kao i jedinka br. 1 i zatim se jedinka br. 4 uzorkuje za rast i histologiju štitnjače (prema ovom primjeru). Taj se postupak nastavlja dok se 20. jedinka ne pridruži ostalim jedinkama nakon 62. stadija NF-a ili se uzorkuje. Upotrijebljeni postupak nasumičnog odabira mora pružiti svakom organizmu u ispitivanju jednaku vjerojatnost da bude izabran. To se može postići primjenom bilo koje metode nasumičnog odabira, ali potrebno je da svaki punoglavac bude umrežen u nekom trenutku tijekom razdoblja poduzorkovanja u 62. stadiju NF-a.

Slika 1.

Hipotetički primjer režima uzorkovanja u 62. stadiju NF-a za jedan spremnik s ponavljanjem



42. Za poduzorkovanje ličinki dobivaju se sljedeće krajnje točke: 1. vrijeme do 62. stadija NF-a (tj. broj dana od oplodnje do 62. stadija NF-a); 2. vanjske abnormalnosti; 3. morfometrijski podaci (npr. masa i duljina) te 4. histologija štitnjače.

Humano usmrćivanje punoglavaca

43. Poduzorak punoglavaca u 62. stadiju NF-a (pet jedinki po ponavljanju) treba eutanazirati uranjanjem u odgovarajuću količinu (npr. 500 ml) otopine anestetika (npr. 0,3-postotnu otopinu MS-222, trikain-metansulfonata, CAS.886-86-2) u trajanju od 30 minuta. Otopinu MS-222 treba puferirati natrijevim bikarbonatom kako bi se postigla pH-vrijednost od približno 7,0 jer je nepuferirana otopina MS-222 kisela i nadražuje kožu žabe, što dovodi do slabe apsorpcije i nepotrebnog dodatnog stresa za organizam.

44. Punoglavac se s pomoću mrežice uklanja iz ispitne komore i prenosi (stavlja) u otopinu za eutanaziju. Životinja se pravilno eutanazira i spremna je za nekropsiju kada ne reagira na vanjske podražaje kao što je štipanje stražnjeg uda pincetom.

Morfometrija (masa i duljina)

45. Mjerenje mokre mase (najbliži miligram) i duljine od vrha njuške do kloake (SVL, engl. *snout-to-vent length*) (najbližih 0,1 mm) svakog punoglavca treba obaviti odmah nakon što prestane reagirati zbog djelovanja anestezije (slika 2.a). Za mjerenje SVL-a s fotografije može se upotrijebiti softver za

▼M8

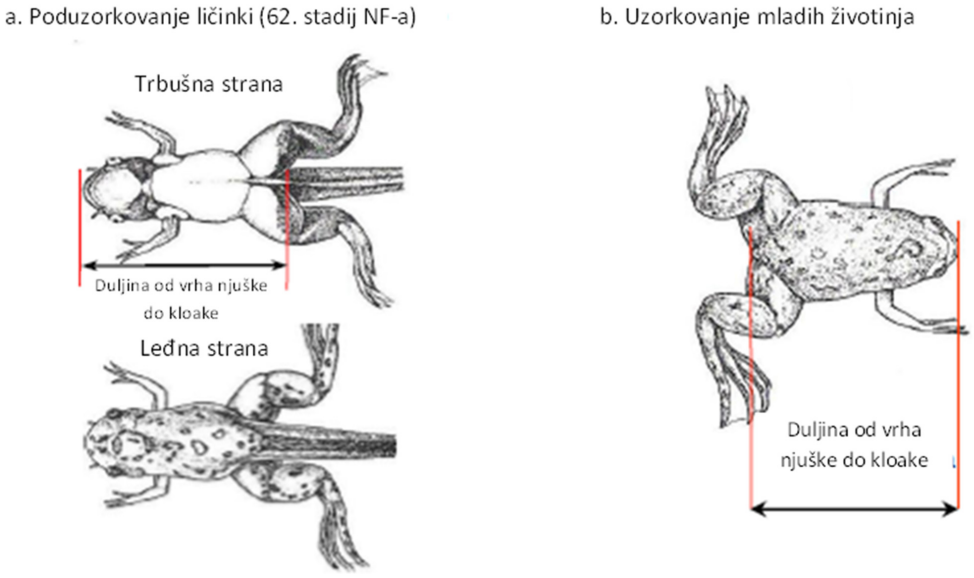
analizu slike. Punoglavce prije vaganja treba osušiti upijajućim materijalom kako bi se uklonio višak vode. Nakon mjerenja veličine tijela (masa i SVL) treba evidentirati ili zabilježiti sve makromorfološke abnormalnosti i/ili kliničke znakove toksičnosti kao što su skolioza (vidjeti Dodatak 8.), petehije i krvarenje te se preporučuje digitalno dokumentiranje. Napominje se da su petehije mala crvena ili ljubičasta krvarenja kapilara kože.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva

46. Za poduzorak ličinki štitnjače se histološki procjenjuju. Donji dio trupa iza prednjih udova uklanja se i odbacuje. Odrezano truplo fiksira se u Davidsonovu fiksativu. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Treba postići primjereno protresanje ili cirkulaciju fiksativa kako bi se primjereno fiksirala tkiva od interesa. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralno puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histologija štitnjače

47. Svaki poduzorak ličinki (fiksirana tkiva) histološki se procjenjuje u pogledu štitnjače, tj. utvrđuju se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (29. i 30.).



Slika 2.: Oznake za mjerenje duljine od vrha njuške do kloake u testu LAGDA u 62. stadiju NF-a (a) i u mladih žaba (b). Odlučujuće karakteristike 62. stadija NF-a (a): glava je jednako široka kao i trup, duljina olfaktornog živca manja je od promjera olfaktornog bulbusa (pogled s leđne strane), a prednji udovi u razini su srca (pogled s trbušne strane). Slike prilagođene iz Nieuwkoop i Faber (1994.).

Kraj izlaganja ličinki

48. S obzirom na početni broj punoglavaca, očekuje se da će vjerojatno doći do malog postotka jedinki koje se nisu normalno razvile i koje neće dovršiti metamorfozu (66. stadij NF-a) u razumnom roku. Dio izlaganja s ličinkama

▼M8

ne bi trebao biti dulji od 70 dana. Sve punoglavce koji preostanu na kraju tog razdoblja treba eutanazirati (vidjeti stavak 43.), izmjeriti njihovu mokru masu i SVL, odrediti njihov stadij prema Nieuwkoopu i Faberu, 1994., i zabilježiti sve razvojne abnormalnosti.

Izdvajanje nakon 66. stadija NF-a

49. Nakon 66. stadija NF-a (potpuna resorpcija repa) treba zadržati deset jedinki po spremniku do kraja izlaganja. Stoga treba obaviti izdvajanje nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a ili nakon 70 dana (ovisno o tome što nastupi ranije). Životinje koje su prošle 66. stadij NF-a koje se neće nastaviti izlagati treba nasumično odabrati.

50. Životinje koje se ne odaberu za nastavak izlaganja eutanaziraju se (vidjeti stavak 43.). Za svaku se životinju provode mjerenja razvojnog stadija, mokre mase i SVL-a (slika 2.b) te makroskopska nekropsija. Fenotipski spol (na temelju morfologije gonada) bilježi se kao ženski, muški ili neodređen.

Uzorkovanje mladih životinja

Okvir za uzorkovanje mladih životinja

51. Preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s vodom za razrjeđivanje (i/ili kontroli s otapalom ako je relevantno). Na kraju razdoblja izlaganja preostale se životinje (najviše deset žaba po ponavljanju) eutanaziraju i mjere se različite krajnje točke ili se ocjenjuju i evidentiraju: 1. morfometrijski podaci (masa i duljina); 2. omjeri fenotipskog/genotipskog spola; 3. masa jetre (somatski indeks jetre); 4. histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubreg) te po želji 5. VTG u plazmi.

Humano usmrćivanje žaba

52. Uzorci mladih životinja, žabe nakon metamorfoze, eutanaziraju se intraperitonealnom injekcijom anestetika, npr. 10-postotnim MS-222 u odgovarajućoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom. Žabe se mogu uzorkovati nakon što prestanu reagirati (obično dvije minute nakon injekcije ako se upotrebljava 10-postotni MS-222 u dozi od 0,01 ml po gramu žabe). Iako bi se mlade žabe mogle uroniti u anestetik više koncentracije (MS-222), iz iskustva je poznato da je potrebno više vremena da se anesteziraju tom metodom i to trajanje možda nije primjereno za omogućivanje uzorkovanja. Injekcija pruža učinkovitu i brzu eutanaziju prije uzorkovanja. Uzorkovanje ne treba započinjati dok se ne potvrdi da žabe ne reagiraju kako bi se osiguralo da su životinje mrtve. Ako žabe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka ih tretirati kao smrtnost. Ako se žaba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i treba izvijestiti o tome. Žaba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje žabe za moguću histopatološku analizu).

Morfometrija (masa i duljina)

53. Mjerenja mokre mase i SVL-a (slika 2.b) ista su kao i ona opisana za poduzorkovanje ličinki.

▼M8

VTG u plazmi (neobavezno)

54. VTG je naširoko prihvaćeni biomarker koji je posljedica izlaganja estrogenim kemikalijama. U testu LAGDA VTG u plazmi može se po želji mjeriti u uzorcima mladih životinja (to može biti osobito relevantno ako se sumnja da je ispitivana kemikalija estrogen).

55. Režu se stražnji udovi eutanaziranih mladih životinja i uzima se krv s pomoću heparinizirane kapilare (iako mogu biti primjerene i druge metode uzimanja krvi, kao što je punkcija srca). Krv se stavlja u epruvetu za mikrocentrifugu (npr. volumena od 1,5 ml) i centrifugira kako bi se dobila plazma. Uzorke plazme treba pohraniti na temperaturi od – 70 °C ili nižoj do utvrđivanja VTG-a. Koncentracija VTG-a u plazmi može se izmjeriti metodom imunoenzimskog testa (ELISA) (Dodatak 6.) ili drugom metodom kao što je masena spektrometrija (31.). Prednost se daje protutijelima specifičnima za vrstu zbog veće osjetljivosti.

Određivanje genetskog spola

56. Genetski spol svake mlade žabe ocjenjuje se na temelju markera koje su razvili Yoshimoto i dr.(11.). Kako bi se utvrdio genetski spol, dio jednog stražnjeg uda ili cijeli ud (ili bilo koje drugo tkivo) koji je uklonjen tijekom seciranja prikuplja se i pohranjuje u epruveti za mikrocentrifugu (uzorci tkiva žaba mogu se dobiti iz bilo kojeg tkiva). Tkivo se može pohraniti na temperaturi od – 20 °C ili nižoj do izoliranja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Izoliranje DNK-a iz tkiva može se obaviti komercijalno dostupnim priborom za ispitivanje, a analiza u kojoj se utvrđuje prisustvo ili odsustvo markera obavlja se primjenom metode lančane reakcije polimerazom (PCR) (Dodatak 5.). Usklađenost histološkog spola i genotipa kod kontrolnih životinja u trenutku uzorkovanja mladih životinja u kontrolnim skupinama općenito je veća od 95 %.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva za histopatologiju

57. Tijekom konačnog uzorkovanja prikupljaju se gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubrezi radi histološke analize. Otvara se trbušna šupljina te se disecira i važe jetra. Zatim se probavni organi (npr. želudac, crijeva) pažljivo uklanjaju iz donjeg abdomena kako bi se otkrile gonade, bubrezi i reproduktivni kanali. Treba zabilježiti sve morfološke abnormalnosti gonada. Naposljetku, treba ukloniti stražnje udove ako već nisu prethodno uklonjeni radi uzimanja krvi. Prikupljene jetre i truplo u kojem su gonade ostavljene *in situ* treba odmah staviti u Davidsonov fiksativ. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histopatologija

58. Svaki uzorak mladih životinja histološki se ocjenjuje u pogledu patologije u tkivu gonada, reproduktivnih kanala, bubrega i jetre, tj. daje se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (32.). Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada (npr. jajnici, testisi, interseksualne) i, zajedno s pojedinačnim mjerenjima genetskog spola, ta se opažanja mogu upotrijebiti za izračun omjera fenotipskog/genotipskog spola.

▼M8

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Statistička analiza

59. U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci (masa, SVL, LSI, VTG); 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (tj. dani od početka testa do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena.

60. Preporučuje se da plan ispitivanja i odabir statističkog testa omoguće odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o vrijednosti NOEC ili ECx. Statističke analize podataka (općenito na temelju srednje vrijednosti ponavljanja) trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (33.). U Dodatku 7. ovoj ispitnoj metodi navedeni su shema odlučivanja preporučene statističke analize i smjernice za obradu podataka i odabir najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu u testu LAGDA.

61. Podatke iz uzorkovanja mladih životinja (npr. rast, LSI) treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol jer se genotipski spol utvrđuje za sve žabe.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitiranih ponavljanja i tretiranja

62. Ponavljanja mogu postati kompromitirana zbog prevelike smrtnosti uzrokovane očitom toksičnošću, bolešću ili tehničkom pogreškom. Ako je tretiranje kompromitirano zbog bolesti ili tehničke pogreške, za analizu trebaju biti dostupna tri nekompromitirana tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Ako u tretiranjima s visokim koncentracijama dođe do očite toksičnosti, poželjno je da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja (u skladu s pristupom najviše prihvatljive koncentracije za smjernice OECD-a za ispitivanje (34.)). Uz smrtnost, znakovi očite toksičnosti mogu uključivati učinke na ponašanje (npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu), morfološke lezije (npr. hemoragijske lezije, abdominalne edeme) ili inhibiciju normalnih odgovora na hranjenje u kvalitativnoj usporedbi s kontrolnim životinjama.

Kontrola s otapalom

63. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće utjecaje otapala (ako se upotrebljava). To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa i duljina) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontroli s vodom za razrjeđivanje ili kontroli s otapalom.

▼M8

Izvješće o ispitivanju

64. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— Tvar s jednim sastojkom:

fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

— Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

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

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje,

— učestalost pojave skolioze u prijašnjim kontrolama za matičnu kulturu koja se upotrebljava.

Ispitni uvjeti:

— fotoperiodi,

— plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj ispitnih organizama po ponavljanju),

— način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),

— metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),

— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni jod, ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,

— nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,

— kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,

▼M8

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

— dokazi o usklađenosti kontrola s kriterijima valjanosti,

— sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: uočena smrtnost i abnormalnosti, vrijeme do 62. stadija NF-a, histološka procjena štitnjače (samo kod uzorka ličinki), rast (masa i duljina), LSI (samo kod uzorka mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (samo kod uzorka mladih životinja), rezultati histopatološke procjene za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (samo kod uzorka mladih životinja) te VTG u plazmi (samo kod uzorka mladih životinja ako se provodi),

— pristup za statističku analizu i obradu podataka (primijenjeni statistički test ili model),

— najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,

— najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $\alpha = 0,05$); ECx za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,

— sva odstupanja od ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

65. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).

66. Srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba izračunati i prikazati kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju. Isto tako, za tretiranja treba izračunati medijan tretiranja i prikazati ga kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju.

LITERATURA

1. U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

2. OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, SAD.

4. Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16.–27.

▼M8

5. Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140.–144.

6. Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

7. Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281.–285.

8. Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335.–340.

9. Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

10. Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143.–150.

11. Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469.–2474.

12. Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117.–123.

13. Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441.–448.

14. Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321.–327.

15. Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159.–169.

16. ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, SAD.

17. Poglavlje C.4. ovog Priloga, Određivanje „lake" biorazgradivosti.

18. Poglavlje C.29. ovog Priloga, Laka biorazgradivost CO2 u zabrtvljenim posudama (test plinskog prostora).

19. Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539.–551.

▼**M8**

20. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593.–9.

21. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

22. Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69.–92.

23. ASTM (2004.). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 – 98, Philadelphia, PA, SAD.

24. Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84. str.

25. Poglavlje C.38. ovog Priloga, Analiza metamorfoze vodozemaca.

26. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reprodukcijski test na ribama.

27. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.

28. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.

29. OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

30. Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415.–424.

31. Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

32. OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

33. OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

34. Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197.–202.

▼M8

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Apikalna krajnja točka: uzrokuje učinke na razini populacije.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

ECx: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC50 je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

dpf: dana nakon oplodnje.

Protočno ispitivanje: ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC): najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti podrobno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodatku 7.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC50): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC): ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

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

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

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

▼**M8**

Dodatak 2.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatak 3.

ISPITNI UVJETI ZA TEST LAGDA

1. Ispitna vrsta	*Xenopus laevis*
2. Vrsta ispitivanja	Kontinuirano protočno
3. Temperatura vode	Nominalna temperatura iznosi 21 °C. Srednja temperatura tijekom ispitivanja iznosi 21 ± 1 °C (razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C).
4. Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar i) od 600 do 2 000 lux (lumeni/m^2) na površini vode
5. Fotoperiod	12 sati svjetla, 12 sati tame
6. Volumen ispitne otopine i ispitna posuda (spremnik)	4–10 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm) Spremnik od stakla ili nehrđajućeg čelika
7. Izmjene volumena ispitnih otopina	Konstantne, uzimajući u obzir i održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikalijama (npr. pet obnavljanja volumena spremnika dnevno)
8. Starost ispitnih organizama na početku	8.–10. stadij prema Nieuwkoopu i Faberu (NF)
9. Broj organizama po ponavljanju	20 životinja (embrija) po spremniku (ponavljanju) na početku izlaganja i deset životinja (mladih životinja) po spremniku (ponavljanju) nakon 66. stadija NF-a do kraja izlaganja
10. Broj tretiranja	Najmanje četiri tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole
11. Broj ponavljanja po tretiranju	Četiri ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i osam ponavljanja za kontrole
12. Broj organizama po ispitnoj koncentraciji	Najmanje 80 životinja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 160 životinja za kontrole
13. Voda za razrjeđivanje	Bilo koja voda koja omogućuje normalan rast i razvoj vrste *X. laevis* (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom)
14. Dozračivanje	Nije potrebno, ali dozračivanje spremnika može biti potrebno ako razina otopljenog kisika padne ispod preporučenih granica i maksimalno se poveća protok ispitne otopine.
15. Otopljeni kisik ispitne otopine	Otopljeni kisik: ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom ili ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH ispitne otopine	6,5–8,5 (razlike između ponavljanja/između tretiranja ne smiju biti veće od 0,5)
17.	Tvrdoća i lužnatost ispitne otopine	10–250 mg $CaCO_3$/l
18.	Režim hranjenja	(Vidjeti Dodatak 4.)
19.	Razdoblje izlaganja	Od 8.–10. stadija NF-a do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontrolnoj skupini s vodom i/ili otapalom (najviše 17 tjedana)
20.	Biološke krajnje točke	Smrtnost (i abnormalne pojave), vrijeme do 62. stadija NF-a (uzorak ličinki), histološka procjena štitnjače (uzorak ličinki), rast (masa i duljina), somatski indeks jetre (uzorak mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (uzorak mladih životinja), histopatologija za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (uzorak mladih životinja) te vitelogenin u plazmi (uzorak mladih životinja, neobavezno)
21.	Kriteriji valjanosti ispitivanja	Otopljeni kisik trebao bi biti > 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja trebale bi biti < 1,0 °C; pH ispitne otopine treba biti u rasponu od 6,5 do 8,5; smrtnost u kontrolama treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju i srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontroli treba biti ≤ 45 dana; srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti 1,0 ± 0,2 g u kontrolama i 11,5 ± 3 g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju); trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

▼M8

Dodatak 4.

REŽIM HRANJENJA

Treba napomenuti da, iako se preporučuje upotreba ovog režima hranjenja, dopuštene su i alternative pod uvjetom da ispitni organizmi rastu i razvijaju se primjerenom brzinom.

Hranjenje ličinki

Priprema za prehranu ličinki

A. 1: 1 (v/v) početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)

1. Početna hrana za pastrve: miješati 50 g početne hrane za pastrve (fine granule ili prah) i 300 ml primjerene filtrirane vode 20 sekundi na visokoj postavci miješalice

2. Smjesa alge/TetraFin® (ili ekvivalentno): miješati 12 g tableta od algi spirulina i 500 ml filtrirane vode na visokoj postavci miješalice 40 sekundi, miješati 12 g hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno) s 500 ml filtrirane vode i zatim pomiješati te dvije smjese kako bi se dobila jedna litra smjese koja sadržava 12 g/l algi spirulina i 12 g/l hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno)

3. Kombinirati jednake volumene izmiješane početne hrane za pastrve i algi/hrane TetraFin® (ili ekvivalentno)

B. Račići Artemia

15 ml jajašaca račića Artemia vali se u 1 l slane vode (pripremljene dodavanjem 20 ml NaCl jednoj litri deionizirane vode). Račići se prikupljaju nakon dozračivanja u trajanju od 24 sata na sobnoj temperaturi i uz stalnu izloženost svjetlosti. Račići se ostavljaju da se slegnu tijekom 30 minuta zaustavljanjem dozračivanja. Ciste koje isplivaju na površinu kanistra izlijevaju se i odbacuju te se račići lijevaju kroz odgovarajuće filtre tako da se dobije 30 ml s filtriranom vodom.

Protokol hranjenja

U tablici 1. nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom izlaganja u stadijima ličinke. Životinje treba hraniti tri puta dnevno od ponedjeljka do petka i jednom dnevno vikendom.

Tablica 1

Režim hranjenja ličinki *X. laevis* u protočnim uvjetima

Vrijeme (*) (nakon oplodnje)	Početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)		Račići Artemia	
	Radni dan (3 puta dnevno)	Vikend (jednom dnevno)	Radni dan (dvaput dnevno)	Vikend (jednom dnevno)
Dani 4.–14. (u tjednima 0.–1.)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dana) 1 ml (od 16. dana)	0,5 ml (od 8. do 15. dana) 1 ml (od 16. dana)
Drugi tjedan	0,67 ml	2,4 ml		
Treći tjedan	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Četvrti tjedan	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Peti tjedan	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Vrijeme (*) (nakon oplodnje)	Početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)		Račići Artemia	
	Radni dan (3 puta dnevno)	Vikend (jednom dnevno)	Radni dan (dvaput dnevno)	Vikend (jednom dnevno)
Šesti tjedan	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Sedmi tjedan	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tjedni 8.–10.	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Nulti dan definira se kao dan ubrizgavanja hCG-a.

Prelazak s prehrane za ličinke na prehranu za mlade životinje

Kako se završava metamorfoza ličinki, prelazi se na formulaciju prehrane za mlade životinje koja je objašnjena u nastavku. Tijekom tog prelaska treba se smanjivati hrana za ličinke i povećavati hrana za mlade životinje. To se može postići proporcionalnim smanjivanjem hrane za ličinke i proporcionalnim povećavanjem hrane za mlade životinje kako svaka skupina od pet punoglavaca prelazi 62. stadij NF-a i približava se dovršetku metamorfoze u 66. stadiju NF-a.

Hranjenje mladih životinja

Prehrana mladih životinja

Kada metamorfoza završi (66. stadij) režim hranjenja mijenja se tako da se upotrebljava samo vrhunska hrana za žabe koja tone od 3/32 inča, (Xenopus Express™, FL, SAD) ili ekvivalentna hrana.

Priprema drobljenih peleta za prelazak iz stadija ličinke u stadij mlade životinje

Peleti hrane za žabe koja tone nakratko se melju u mlincu za kavu, miješalici ili tarionikom i tučkom kako bi se smanjili za približno 1/3. Preduga obrada dovodi do nastanka praha i ne preporučuje se.

Protokol hranjenja

U **tablici 2.** nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom životnih stadija mladih i odraslih životinja. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Treba napomenuti da, kako životinje prolaze kroz metamorfozu, nastavlja im se davati porcija račića Artemia dok više od 95 % životinja ne prođe kroz metamorfozu.

Životinje ne treba hraniti na dan završetka ispitivanja tako da hrana ne poremeti mjerenja mase.

Tablica 2.

Režim hranjenja mladih životinja *X. laevis* u protočnim uvjetima. Treba napomenuti da životinje koje ne prođu kroz metamorfozu, uključujući one čija je metamorfoza odgođena tretiranjem kemikalijom, ne mogu jesti pelete koji nisu razdrobljeni

Vrijeme (*) (Tjedni nakon srednjeg datuma metamorfoze)	Drobljeni peleti (mg po mladoj žabi)	Cijeli peleti (mg po mladoj žabi)
Po završetku metamorfoze životinja	25	0
Tjedni 0.–1.	25	28

▼**M8**

Vrijeme (*) (Tjedni nakon srednjeg datuma metamorfoze)	Drobljeni peleti (mg po mladoj žabi)	Cijeli peleti (mg po mladoj žabi)
Tjedni 2.–3.	0	110
Tjedni 4.–5.	0	165
Tjedni 6.–9.	0	220

(*) Prvi dan nultog tjedna srednji je datum metamorfoze kod kontrolnih životinja.

▼M8

Dodatak 5.

ODREĐIVANJE GENETSKOG SPOLA

Metoda genetskog određivanja spola za vrstu *Xenopus laevis* temelji se na publikaciji Yoshimoto i dr., 2008. Podroban opis postupaka genotipizacije po potrebi se može pronaći u toj publikaciji. Mogu se upotrijebiti alternativne metode (npr. qPCR velike propusnosti) ako se to smatra primjerenim.

Početnice za vrstu *X. laevis*

Marker za DM-W

Uzvodna: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Nizvodna: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivna kontrola

Uzvodna: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Nizvodna: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Pročišćavanje DNK-a

Treba pročistiti DNK iz mišićnog tkiva ili tkiva kože upotrebom, na primjer, kompleta za krv i tkiva Qiagen DNeasy (kat. br. 69506) ili sličnog proizvoda u skladu s uputama za komplet. DNK se može eluirati iz kolona za pročišćavanje upotrebom manje količine pufera kako bi se dobili uzorci veće koncentracije ako se to smatra potrebnim za PCR. Napominje se da je DNK prilično stabilan pa treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija koja bi mogla dovesti do pogrešne karakterizacije mužjaka kao ženki ili obrnuto.

PCR

Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStart™ *Taq* proizvođača Sigma opisan je u **tablici 1**.

Tablica 1.

Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStart™ *Taq* proizvođača Sigma

Glavna mješavina	1x (µl)	[Konačno]
NFW (*)	11	–
10X pufer	2,0	–
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-i (10 mM za svaki)	0,4	200 µM
Marker uzvodne početnice (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker nizvodne početnice (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola uzvodne početnice (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola nizvodne početnice (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jedinica/µl
Kalup DNK-a	1,0	~ 200 pg/µl

(*) voda bez nukleaza
Napomena: kod pripreme glavnih mješavina treba pripremiti više nego što je potrebno kako bi se uzeo u obzir gubitak do kojeg može doći tijekom pipetiranja (na primjer: 25x treba upotrebljavati za samo 24 reakcije).

▼M8

Reakcija:

Glavna mješavina	19,0 µl
Kalup	1,0 µl
Ukupno	20,0 µl

Profil uređaja za PCR:

Korak 1.	94 °C	1 min
Korak 2.	94 °C	30 s
Korak 3.	60 °C	30 s
Korak 4.	72 °C	1 min
Korak 5.	Idi na korak 2.	35 ciklusa
Korak 6.	72 °C	1 min
Korak 7.	4 °C	zadržati

Produkti PCR-a mogu se odmah razdvojiti u gelu ili pohraniti na temperaturi od 4 °C.

Elektroforeza u agaroznom gelu (3 %) (uzorak protokola)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ledena octena kiselina	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Dodati vodu do 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaroza u omjeru 3: 1

3 dijela agaroze NuSieve™ GTG™

1 dio agaroze niske elektroendoosmoze proizvođača Fisher (EEO)

Metoda

1. Pripremiti 3-postotni gel dodavanjem 1,2 g mješavine agaroze u 43 ml 1X TAE. Promiješati kako bi se odvojile velike grude.

2. Tretirati smjesu agaroze mikrovalovima dok se potpuno ne otopi (izbjegavati vrenje). Pustiti da se malo ohladi.

3. Dodati 1,0 µl etidijeva bromida (10 mg/ml). Promiješati tikvicu. Napominje se da je etidijev bromid mutagen pa bi, u mjeri u kojoj je to tehnički izvedivo, za ovaj korak trebalo upotrijebiti alternativne kemikalije kako bi se smanjili zdravstveni rizici za radnike ([1]).

4. Uliti gel u kalup s češljem. Potpuno ohladiti.

([1]) U skladu s člankom 4. stavkom 1. Direktive 2004/37/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o zaštiti radnika od rizika zbog izloženosti karcinogenim ili mutagenim tvarima na radu (šesta pojedinačna direktiva u smislu članka 16. stavka 1. Direktive Vijeća 89/391/EEZ) (SL L 158, 30.4.2004., str. 50.).

▼**M8**

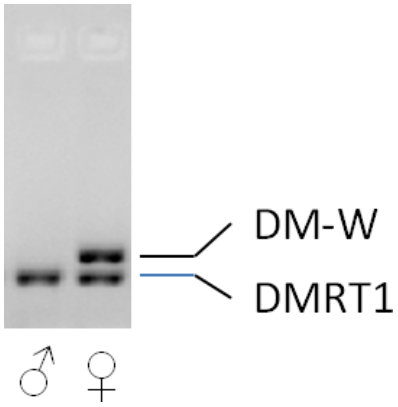
5. Dodati gel u uređaj. Prekriti gel s 1X TAE.

6. Dodati 1 µl 6x boje za nanošenje u svakih 10 µl produkta PCR-a.

7. Pipetirati uzorke u jažice.

8. Razdvajati ~ 20 minuta na stalnih 160 volta.

Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorke vrpce koji ukazuju na muške i ženske jedinke nalazi se na **slici 1**.



Slika 1. Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorak vrpce koji ukazuje na mušku (♂) jedinku (jednostruka vrpca ~ 203 bp: DMRT1) i žensku (♀) jedinku (dvostruke vrpce pri ~ 259 bp: DM-W i 203 bp: DMRT1).

LITERATURA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469.–2474.

▼M8

Dodatak 6.

MJERENJE VITELOGENINA

Vitelogenin (VTG) mjeri se upotrebom metode imunoenzimskog testa (ELISA) koji je izvorno razvijen za VTG debeloglave gavčice (Parks i dr., 1999.). Trenutačno ne postoje komercijalno dostupna protutijela za vrstu *X. laevis*. Međutim, s obzirom na veliku količinu informacija za taj protein i dostupnost isplativih komercijalnih usluga za proizvodnju protutijela, razumno je za očekivati da laboratoriji mogu jednostavno razviti test ELISA za to mjerenje (Olmstead i dr., 2009.). Olmstead i dr. (2009.) navode i opis testa izmijenjenog za VTG kod vrste *X. tropicalis*, kako je prikazano u nastavku. U metodi se upotrebljava protutijelo za VTG vrste *X. tropicalis*, ali poznato je da funkcionira i za VTG vrste *X. laevis*. Treba napomenuti da se mogu upotrebljavati i nekonkurentni testovi ELISA i da oni mogu imati niže granice otkrivanja od metode opisane u nastavku.

Materijali i reagensi

— Unaprijed adsorbirani serum 1. protutijela (Ab)

— Pomiješati jedan dio seruma 1. protutijela anti-*X. tropicalis* VTG s dva dijela kontrolne plazme mužjaka i ostaviti na sobnoj temperaturi na ~ 75 minuta, staviti na led 30 min, centrifugirati > 20K x G jedan sat na 4 °C, ukloniti supernatant, alikvotirati, pohraniti na – 20 °C.

— 2. protutijelo

— Kozji anti-zečji IgG-HRP konjugat (npr. Bio-Rad 172-1019)

— Standard VTG-a

— pročišćeni VTG vrste *X. laevis* od 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00 ili Sigma T0440)

— Obični kozji serum (NGS)(npr. Chemicon® S26 – 100 ml)

— EIA polistirenske mikrotitracijske ploče s 96 jažica (npr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Hibridizacijska peć temperature 37 °C (ili zračni inkubatori za brzo uravnoteživanje) za ploče, vodena kupelj za epruvete

— Ostala uobičajena laboratorijska oprema, kemikalije i zalihe

Recepti

Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

▼M8

Pufer za ispiranje (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Prilagoditi pH-vrijednost na 7,3 s 1 M HCl, zatim dodati 0,5 ml kemikalije Tween-20

Testni pufer:

Obični kozji serum (NGS)	3,75 ml
Pufer za ispiranje	146,25 ml

Prikupljanje uzoraka

Krv se uzima s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice i stavlja na led. Nakon tri minute centrifugiranja cjevčica se ocjenjuje, otvara i plazma se stavlja u epruvete za mikrocentrifugu od 0,6 ml koje sadržavaju 0,13 jedinica liofiliziranog aprotinina (te se epruvete unaprijed pripremaju dodavanjem odgovarajuće količine aprotinina, zamrzavanjem i liofiliziranjem u vakuumskoj centrifugi na niskoj toplini dok se ne osuše). Plazma se sprema na temperaturi od – 80 °C dok se ne analizira.

Postupak za jednu ploču

Premazivanje ploče

Pomiješati 20 µl pročišćenog VTG-a s 22 ml karbonatnog pufera (konačna koncentracija od 3 µg/ml). Dodati 200 µl u svaku jažicu ploče s 96 jažica. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Blokiranje ploče

Otopina za blokiranje priprema se dodavanjem 2 ml običnog kozjeg seruma (NGS) u 38 ml pufera karbonata. Ukloniti otopinu premaza i osušiti protresanjem. Dodati 350 µl otopine za blokiranje u svaku jažicu. Prekriti ljepljivim filmom za zatvaranje i inkubirati na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Priprema standarda

Miješa se 5,8 µl pročišćenog standarda VTG-a s 1,5 ml testnog pufera u jednokratnoj epruveti od borosilikatnog stakla dimenzija 12 × 75 mm. Tako se dobiva 12 760 ng/ml. Zatim se provodi serijsko razrjeđivanje dodavanjem 750 µl prethodnog razrjeđenja u 750 µl testnog pufera kako bi se dobile konačne koncentracije od 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 i 50 ng/ml.

Priprema uzoraka

Početi s razrjeđivanjem plazme u testnom puferu u omjeru 1: 300 (npr. kombinirati 1 µl plazme s 299 µl testnog pufera) ili 1: 30. Ako se očekuje velika količina VTG-a mogu biti potrebna dodatna ili veća razrjeđenja. B/B_o treba nastojati održati u rasponu standarda. Za uzorke bez znatnog VTG-a, npr. kontrolni mužjaci i ženke (svi su nezreli), upotrijebiti razrjeđivanje 1: 30. Slabije razrijeđeni uzorci mogu pokazati neželjene učinke matrice.

Osim toga, preporučuje se provođenje pozitivnog kontrolnog uzorka na svakoj ploči. On se uzima iz zalihe plazme koja sadržava visoke inducirane razine VTG-a. Zaliha se prvo razrjeđuje u NGS-u, dijeli u alikvote i pohranjuje na temperaturi od – 80 °C. Alikvot se odmrzava za svaku ploču, dodatno razrjeđuje u testnom puferu i obrađuje na sličan način kao i ispitni uzorak.

▼M8

Inkubacija s 1. protutijelom

Prvo protutijelo priprema se izradom razrjeđenja unaprijed adsorbiranog seruma 1. protutijela u testnom puferu u omjeru 1: 2000 (npr. 8 µl u 16 ml testnog pufera). Kombinirati 300 µl otopine 1. protutijela i 300 µl uzorka/standarda u staklenoj epruveti. Epruveta B_o priprema se na sličan način s 300 µl testnog pufera i 300 µl protutijela. Isto tako, treba pripremiti epruvetu NSB upotrebom samo 600 µl testnog pufera, tj. bez protutijela. Prekriti epruvete parafilmom i lagano protresti kako bi se promiješalo. Inkubirati jedan sat u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C.

Ispiranje ploče

Isprati ploču neposredno prije dovršetka inkubacije 1. protutijela. To se obavlja izlijevanjem sadržaja i tapšanjem upijajućim papirom dok se ne osuši. Zatim napuniti jažice s 350 µl otopine za ispiranje, proliti i osušiti tapšanjem. Za to je korisna višekanalna repetitivna pipeta ili ispirač ploča. Korak ispiranja ponavlja se još dva puta tako da se ukupno ispire tri puta.

Punjenje ploče

Nakon što se ploča ispere ukloniti epruvete iz vodene kupke i lagano promiješati. Dodati 200 µl iz svake epruvete uzorka, standarda, B_o i NSB-a u dvije jažice ploče. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira jedan sat na 37 °C.

Inkubacija s 2. protutijelom

Na kraju inkubacije iz prethodnog koraka ploču opet treba isprati tri puta, kako je prethodno opisano. Razrijeđeno 2. protutijelo priprema se miješanjem 2,5 µl 2. protutijela s 50 ml testnog pufera. Dodati 200 µl razrijeđenog 2. protutijela u svaku jažicu, zatvoriti kako je prethodno opisano i inkubirati jedan sat na 37 °C.

Dodavanje supstrata

Nakon dovršetka inkubacije s 2. protutijelom isprati ploču tri puta kako je prethodno opisano. Zatim u svaku jažicu dodati 100 µl supstrata TMB. Pustiti da se reakcija odvija deset minuta, po mogućnosti ne na jarkoj svjetlosti. Zaustaviti reakciju dodavanjem 100 µl fosforne kiseline od 1 M. Time će se boja promijeniti iz plave u intenzivnu žutu. Izmjeriti apsorbanciju pri 450 nm upotrebom čitača ploča.

Izračun vrijednosti B/Bo

Oduzeti vrijednost NSB od svih mjerenja. B/B_o za svaki uzorak i standard računa se tako da se vrijednost apsorbancije (B) podijeli prosječnom apsorbancijom uzorka B_o.

Dobivanje standardne krivulje i utvrđivanje nepoznatih količina

Izraditi standardnu krivulju s pomoću nekog računalnog softvera za izradu grafova (npr. Slidewrite™ ili Sigma Plot®) kojim će se ekstrapolirati količina iz vrijednosti B/B_o uzorka na temelju vrijednosti B/B_o standarda. Količina se obično grafički prikazuje na logaritamskoj skali i krivulja ima sigmoidni oblik. Međutim, može se činiti linearnom ako se upotrebljava uzak raspon standarda. Ispraviti količine uzorka za faktor razrjeđivanja i navesti u obliku miligrama VTG-a po mililitru plazme.

Utvrđivanje najnižih granica detekcije (MDL, engl. minimum detection limits)

Često neće biti jasno, osobito kod normalnih mužjaka, kako izvijestiti o rezultatima iz niskih vrijednosti. U tim slučajevima treba upotrijebiti granicu pouzdanosti od 95 % kako bi se utvrdilo treba li vrijednost prikazati kao nulu ili neki drugi broj. Ako je rezultat uzorka unutar intervala pouzdanosti nultog standarda

▼**M8**

(B_o), rezultat treba prikazati kao nulu. Najniža razina detekcije bit će najniži standard koji je dosljedno različit od nultog standarda; drugim riječima, ta dva intervala pouzdanosti ne preklapaju se. Za bilo koji rezultat uzorka koji je unutar granice pouzdanosti najmanje razine detekcije ili veći, izvijestit će se o izračunanoj vrijednosti. Ako se uzorak nalazi između nultog standarda i intervala pouzdanosti najmanje granice detekcije, kao vrijednost tog uzorka treba navesti polovinu najmanje razine detekcije.

LITERATURA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117.–123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113.-125.

▼M8

Dodatak 7.

STATISTIČKA ANALIZA

U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci; 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (vrijeme do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena. Shema odlučivanja preporučene statističke analize za test LAGDA prikazana je na slici 1. Isto tako, u nastavku su navedene i određene bilješke koje će možda biti potrebne za provedbu statističke analize za mjerenja iz testa LAGDA. Za shemu odlučivanja analize, rezultate mjerenja za smrtnost, rast (masa i duljina) te somatski indeks jetre (LSI) treba analizirati u skladu s granom „Ostale krajnje točke”.

Kontinuirani podaci

Podatke za kontinuirane krajnje točke prvo treba provjeriti u pogledu monotoničnosti tako da se podaci transformiraju rangiranjem, prilagode modelu ANOVA i da se usporede linearni i kvadratni kontrasti. Ako su podaci monotonični, treba provesti postupni Jonckheere-Terpstraov test trenda na medijanima ponavljanja i ne treba primijeniti nikakvu naknadnu analizu. Alternativa za podatke koji su normalno distribuirani s homogenim varijancama jest Williamsov test postupnog snižavanja. Ako podaci nisu monotonični (kvadratni je kontrast znatan, a linearni nije), treba ih analizirati upotrebom modela ANOVA s miješanim učincima. Podatke zatim treba procijeniti u pogledu normalnosti (po mogućnosti upotrebom Shapiro-Wilksova ili Anderson-Darlingova testa) i homogenosti varijanci (po mogućnosti upotrebom Leveneova testa). Oba se testa provode na rezidualima iz modela ANOVA s miješanim učincima. Umjesto tih formalnih ispitivanja normalnosti i homogenosti varijanci, može se upotrebljavati stručna procjena iako su formalni testovi poželjni. Ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama, pretpostavke ANOVA-e s miješanim učincima ispunjene su i značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnettovim testom. Ako se utvrdi nenormalnost ili heterogenost varijanci, prekršene su pretpostavke Dunnettova testa i traži se normalizirajuća pretvorba za stabiliziranje varijanci. Ako se ne pronađe takva pretvorba, značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnovim testom. Kad god je to moguće treba provesti jednosmjerno testiranje za razliku od dvosmjernog testiranja, ali potrebna je stručna prosudba kako bi se utvrdilo koji je test primjeren za određenu krajnju točku.

Smrtnost

Podatke o smrtnosti treba analizirati za razdoblje koje obuhvaća cijeli test i treba ih izraziti kao udio životinja koje su uginule u svim pojedinačnim spremnicima. Punoglavce koji ne dovrše metamorfozu u utvrđenom roku, punoglavce iz poduzorka ličinki, mlade žabe koje se izdvajaju i sve životinje koje uginu zbog pogreške osobe koja provodi pokus treba tretirati kao cenzurirane podatke i ne treba ih uključiti u nazivnik izračuna postotka. Prije bilo kakve statističke analize udjele smrtnosti treba provesti transformacijom arkus sinusa drugog korijena. Kao druga mogućnost može se upotrijebiti Cochran-Armitageov test postupnog snižavanja, možda s Rao-Scottovom prilagodbom ako je prisutna pretjerana disperzija.

Masa i duljina (podaci o rastu)

Mužjaci i ženke nisu spolno dimorfni tijekom metamorfoze pa podatke o rastu iz poduzorka ličinki treba analizirati neovisno o spolu. Međutim, podatke o rastu mladih životinja treba analizirati zasebno na temelju genetskog spola. Za te će krajnje točke možda biti potrebne logaritamske pretvorbe jer nije neuobičajena logaritamska normalnost podataka o veličini.

▼M8

Somatski indeks jetre (LSI)

Mase jetre treba normalizirati kao udjele masa cijelog tijela (tj. LSI) i analizirati zasebno na temelju genetskog spola.

Vrijeme do 62. stadija NF-a

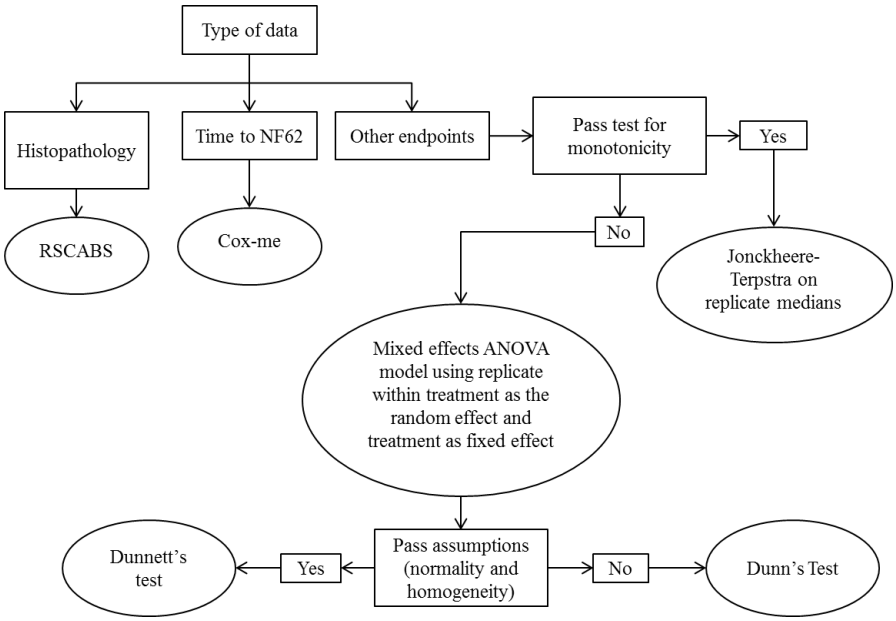
Podatke o vremenu do metamorfoze treba tretirati kao podatke o vremenu do određenog događaja, a smrtne slučajeve ili jedinke koje ne dosegnu 62. stadij NF-a za 70 dana treba tretirati kao podatke koji se cenzuriraju desno (tj. prava vrijednost veća je od 70 dana, ali studija završava prije nego što životinje dosegnu 62. stadij NF-a u 70 dana). Za utvrđivanje datuma kraja ispitivanja treba upotrijebiti srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze u 62. stadiju NF-a u kontrolama s vodom za razrjeđivanje. Srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze moglo bi se utvrditi Kaplan-Meierovim procjeniteljima ograničenja produkta. Tu krajnju točku treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima kojim se uzima u obzir struktura ponavljanja studije.

Histopatološki podaci (ocjene ozbiljnosti i razvojni stadiji)

Histopatološki podaci u obliku su ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija. U testu nazvanom RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) upotrebljava se Cochran-Armitageov test trenda postupnog snižavanja s Rao-Scottovom prilagodbom na svakoj razini ozbiljnosti u histopatološkom odgovoru (Green i dr., 2014.). Rao-Scottovom prilagodbom u test se uključuje plan izvođenja pokusa u posudama s ponavljanjima. Postupak u dijelovima (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ozbiljnost učinka obično povećava s povećanjem doza ili koncentracija, uz zadržavanje ocjena za pojedinačne ispitne životinje i otkrivanje ozbiljnosti bilo kakvog utvrđenog učinka. Postupkom RSCABS ne utvrđuje se samo koja su tretiranja statistički različita od kontrola (tj. imaju ozbiljniju patologiju od kontrola), već se utvrđuje i pri kojoj ocjeni ozbiljnosti dolazi do razlike, čime se osigurava i neophodan kontekst za analizu. U slučaju određivanja stadija razvoja gonada i reproduktivnih kanala, na podatke treba primijeniti dodatnu manipulaciju jer se u RSCABS-u pretpostavlja da se ozbiljnost učinka povećava s povećanjem doze. Uočeni učinak mogla bi biti odgoda ili ubrzanje razvoja. Stoga podatke o određivanju stadija razvoja treba analizirati kako je navedeno da bi se otkrio ubrzani razvoj i zatim ručno obrnuti prije druge analize za otkrivanje kašnjenja u razvoju.

Slika 1.

Shema odlučivanja statističke analize za test LAGDA



▼**M8**

LITERATURA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108.–1116.

▼M8

Dodatak 8.

RAZMATRANJA ZA PRAĆENJE I SMANJENJE UČESTALOSTI POJAVE SKOLIOZE

Idiopatska skolioza, koja se kod punoglavaca *Xenopus laevis* obično očituje kao savijeni rep, može otežati morfološka opažanja i opažanja ponašanja kod ispitnih populacija. Treba nastojati smanjiti ili ukloniti pojavu skolioze, i u matičnoj kulturi i u ispitnim uvjetima. Preporučuje se da u konačnom ispitivanju učestalost pojave umjerene i teške skolioze bude manja od 10 % kako bi se poboljšala pouzdanost da se ispitivanjem mogu otkriti razvojni učinci povezani s tretiranjem kod ličinki vodozemaca koje su inače zdrave.

U svakodnevnim opažanjima tijekom konačnog ispitivanja treba evidentirati učestalost (pojedinačni broj) i ozbiljnost skolioze, ako je prisutna. Prirodu abnormalnosti treba opisati s obzirom na lokaciju (npr. ispred ili iza kloake) i smjer zakrivljenosti (npr. bočno ili od leđne do trbušne strane). Ozbiljnost se može ocijeniti na sljedeći način:

(NR) Nije značajna: nema zakrivljenosti

(1) Minimalna: lagana bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva samo pri mirovanju

(2) Umjerena: bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva stalno, ali ne sprječava kretanje

(3) Teška: bočna zakrivljenost ispred kloake ILI bilo kakva zakrivljenost koja sprječava kretanje ILI zakrivljenost od leđne do trbušne strane

Znanstvena savjetodavna komisija američke agencije EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013.) pregledala je sažete podatke za skoliozu u 15 analiza metamorfoze vodozemaca s vrstom *X. laevis* (od 51. do 60. i kasnijih stadija NF-a) i dala je opće preporuke za smanjenje učestalosti pojave te abnormalnosti u ispitnim populacijama. Preporuke su relevantne za test LAGDA iako ovo ispitivanje ne uključuje dulji vremenski okvir razvoja.

Uspješnost mriješćenja u prijašnjim ispitivanjima

Obično bi se kao uzgojni parovi trebale upotrebljavati visokokvalitetne, zdrave, odrasle životinje; uklanjanjem uzgojnih parova koji daju potomke sa skoliozom može se s vremenom smanjiti učestalost njezine pojave. Točnije, može biti korisno smanjiti upotrebu divlje ulovljenih životinja za rasplod. Razdoblje izlaganja u testu LAGDA započinje s embrijima od 8. do 10. stadija NF-a i na početku ispitivanja nije moguće utvrditi hoće li se kod određenih jedinki javiti skolioza. Stoga uz praćenje učestalosti pojave skolioze kod životinja koje se ispituju treba evidentirati i prijašnju uspješnost legla (uključujući učestalost pojave skolioze kod svih ličinki kojima je omogućen razvoj). Može biti korisno nastaviti pratiti dio svakog legla koji se ne upotrebljava u određenoj studiji i izvijestiti o tim opažanjima (FIFRA SAP 2013.).

Kakvoća vode

Važno je osigurati primjerenu kakvoću vode, i u laboratorijskoj zalihi i tijekom ispitivanja. Uz kriterije kakvoće vode koji se rutinski ocjenjuju za ispitivanja toksičnosti u vodi, može biti korisno pratiti i ispraviti bilo kakve nedostatke hranjivih tvari (npr. nedostatak vitamina C, kalcija, fosfora) ili previsoke razine selena i bakra, za koje je navedeno da u različitim stupnjevima uzrokuju skoliozu kod vrsta *Rana* sp. i *Xenopus* sp. uzgojenih u laboratoriju (Marshall i dr., 1980.; Leibovitz i dr., 1992.; Martinez i dr., 1992; kako je navedeno u FIFRA SAP 2013.). Upotrebom primjerenog režima prehrane (vidjeti Dodatak 4.) i redovitim čišćenjem spremnika općenito će se poboljšati kakvoća vode i zdravlje ispitnih uzoraka.

▼M8

Prehrana

Posebne preporuke za režim prehrane, za koji se pokazalo da je uspješan u testu LAGDA, podrobno su opisane u Dodatku 4. Preporučuje se da se izvori hrane pregledaju u pogledu bioloških toksina, herbicida i ostalih vrsta pesticida za koje je poznato da uzrokuju skoliozu kod vrste *X. laevis* ili drugih vodenih životinja (Schlenk i Jenkins 2013.). Na primjer, izlaganje određenim inhibitorima kolinesteraze povezano je sa skoliozom u riba (Schultz i dr., 1985.) i žaba (Bacchetta i dr., 2008.).

LITERATURA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment, 392.: 110.–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185.-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322.-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445.-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314.-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21. – 23. svibnja 2013. Washington, DC.